

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Farmacología y Terapéutica**



**“IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA  
FARMACOCINÉTICA, FARMACODINAMIA Y PERFIL DE  
SEGURIDAD DE ARIPIPRAZOL”**

**Memoria que presenta Carmen Belmonte Campillo para optar al Grado  
de Doctor**

**Directores:**

**Dr. Francisco Abad Santos**

**Dra. Dolores Ochoa Mazarro**

**2018**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>ABREVIATURAS.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA A LOS FÁRMACOS</b>        | <b>19</b> |
| 1.1    Variaciones interindividuales en la respuesta al tratamiento   | 19        |
| 1.2    Factores que afectan a la respuesta farmacológica              | 21        |
| 1.3    Farmacocinética  | 22        |
| <b>2. FARMACOGENÉTICA Y MEDICINA PERSONALIZADA</b>                    | <b>25</b> |
| 2.1    Variaciones genéticas  | 25        |
| <b>3. ESQUIZOFRENIA</b>   | <b>27</b> |
| 3.1    Etiopatogenia  | 27        |
| 3.2    Tratamiento de la esquizofrenia                                | 28        |
| <b>4. ARIPIPRAZOL</b>   | <b>29</b> |
| 4.1    Mecanismo de acción  | 29        |
| 4.2    Farmacocinética  | 30        |
| 4.3    Perfil de seguridad  | 32        |
| <b>5. ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS PREVIOS CON ARIPIPRAZOL</b>           | <b>33</b> |
| 5.1    Genes relacionados con la farmacocinética de aripiprazol       | 33        |
| 5.1.1    CYP2D6   | 33        |
| 5.1.2    CYP3A4   | 39        |
| 5.1.3    CYP3A5   | 40        |
| 5.1.4    Glicoproteína P  | 42        |
| 5.2    Genes relacionados con la farmacodinamia de aripiprazol        | 43        |
| 5.2.1    Receptores de dopamina                                       | 43        |
| 5.2.2    Receptores de serotonina                                     | 44        |
| <b>6. IMPLEMENTACIÓN DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA</b> | <b>45</b> |
| 6.1    ¿Puede funcionar realmente la medicina personalizada?          | 47        |
| <b>7. JUSTIFICACIÓN</b>   | <b>48</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>                                   | <b>49</b> |
| <b>1. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>  | <b>51</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | <b>51</b> |
| 2.1 Objetivo general  | 51        |
| 2.2 Objetivos específicos   | 51        |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                   | <b>53</b> |
| <b>1. POBLACIÓN ESTUDIADA</b>   | <b>55</b> |
| <b>2. DISEÑO DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS</b>                                | <b>56</b> |
| <b>3. MÉTODO ANALÍTICO</b>  | <b>58</b> |
| 3.1 Extracción y procesamiento de las muestras                          | 58        |
| 3.2 Determinación analítica de aripiprazol                              | 58        |
| 3.3 Determinación analítica de dehidro-aripiprazol                      | 58        |
| <b>4. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO</b>                                      | <b>61</b> |
| <b>5. ANÁLISIS FARMACODINÁMICO</b>                                      | <b>63</b> |
| 5.1 Análisis de la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos  | 63        |
| 5.2 Determinación de prolactina en plasma                               | 63        |
| <b>6. GENOTIPADO</b>  | <b>65</b> |
| 6.1 Extracción de ADN   | 65        |
| 6.2 Selección de polimorfismos genéticos                                | 65        |
| 6.3 Genotipado mediante sondas “FRET”                                   | 66        |
| 6.4 Genotipado mediante sondas Taqman                                   | 68        |
| 6.5 Determinación del número de copias del gen <i>CYP2D6</i>            | 71        |
| 6.6 Determinación del alelo <i>CYP3A4*20</i>                            | 73        |
| <b>7. RECOGIDA Y CLASIFICACIÓN DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS</b>          | <b>73</b> |
| <b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>  | <b>75</b> |
| 8.1 Análisis estadístico de los polimorfismos genéticos                 | 75        |
| 8.2 Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos             | 76        |
| 8.3 Análisis estadístico de las reacciones adversas                     | 76        |
| 8.4 Análisis estadístico de los parámetros farmacodinámicos             | 77        |
| 8.5 Análisis multivariante  | 77        |
| 8.5.1 Estudio de factores que afectan a los parámetros farmacocinéticos | 77        |
| 8.5.2 Estudio de factores que afectan a las reacciones adversas         | 78        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>IV. RESULTADOS.....</b>  | <b>79</b>  |
| <b>1. POBLACIÓN ESTUDIADA</b>   | <b>81</b>  |
| 1.1 Características demográficas  | 81         |
| 1.2 Características genotípicas   | 81         |
| 1.2.1 Comparación de las frecuencias alélicas frente a otras poblaciones caucásicas                       | 83         |
| 1.2.2 Diferencias en las frecuencias genotípicas frente al sexo   | 86         |
| <b>2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO</b>  | <b>88</b>  |
| 2.1 Datos de biodisponibilidad y bioequivalencia  | 89         |
| 2.2 Parámetros farmacocinéticos   | 90         |
| 2.3 Influencia del sexo en la farmacocinética   | 91         |
| 2.4 Influencia de los polimorfismos genéticos en la farmacocinética                                       | 92         |
| 2.4.1 Influencia del CYP2D6 en la farmacocinética de aripiprazol  | 92         |
| 2.4.2 Influencia del CYP3A4 en la farmacocinética de aripiprazol  | 93         |
| 2.4.3 Influencia del CYP3A5 en la farmacocinética de aripiprazol  | 94         |
| 2.4.4 Influencia del ABCB1 en la farmacocinética de aripiprazol   | 95         |
| 2.4.5 Análisis farmacocinético de regresión múltiple  | 97         |
| <b>3. ANÁLISIS FARMACODINÁMICO</b>  | <b>98</b>  |
| 3.1 Análisis de la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos                                    | 98         |
| 3.1.1 Influencia del sexo en la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos                       | 100        |
| 3.1.2 Influencia de los polimorfismos genéticos en la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos | 100        |
| 3.1.3 Análisis de regresión lineal múltiple: tensión arterial y parámetros electrocardiográficos          | 101        |
| 3.2 Análisis de la concentración de prolactina en plasma  | 102        |
| <b>4. SEGURIDAD Y TOLERABILIDAD</b>   | <b>104</b> |
| 4.1 Influencia del sexo en las reacciones adversas  | 106        |
| 4.2 Influencia de la farmacocinética en las reacciones adversas   | 107        |
| 4.3 Influencia de los polimorfismos genéticos en las reacciones adversas                                  | 109        |
| 4.4 Modelo final de variables que afectan al desarrollo de RAM en el tratamiento con aripiprazol          | 112        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>V. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>116</b> |
| <b>1. POBLACIÓN ESTUDIADA</b>   | <b>118</b> |
| 1.1 Comparación de las frecuencias alélicas frente a otras poblaciones caucásicas | 118        |
| 1.2 Diferencias en las frecuencias genotípicas frente al sexo                     | 121        |
| <b>2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO</b>  | <b>122</b> |
| 2.1 Datos de biodisponibilidad y bioequivalencia y análisis farmacocinético       | 122        |
| 2.2 Influencia del sexo en la farmacocinética                                     | 122        |
| 2.3 Influencia de los polimorfismos genéticos en la farmacocinética               | 123        |
| 2.3.1 Influencia del CYP2D6 en la farmacocinética de aripiprazol                  | 123        |
| 2.3.2 Influencia del CYP3A4 en la farmacocinética de aripiprazol                  | 124        |
| 2.3.3 Influencia del CYP3A5 en la farmacocinética de aripiprazol                  | 124        |
| 2.3.4 Influencia del ABCB1 en la farmacocinética de aripiprazol                   | 125        |
| <b>3. ANÁLISIS FARMACODINÁMICO</b>  | <b>126</b> |
| 3.1 Análisis de la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos (QTc y FC) | 126        |
| 3.1.1 Influencia del sexo en la farmacodinamia                                    | 127        |
| 3.1.2 Influencia de los polimorfismos genéticos en la farmacodinamia              | 128        |
| 3.2 Análisis de la concentración de prolactina en plasma                          | 129        |
| <b>4. SEGURIDAD Y TOLERABILIDAD</b>   | <b>130</b> |
| 4.1 Influencia del sexo en las reacciones adversas                                | 130        |
| 4.2 Influencia de la farmacocinética en las reacciones adversas                   | 130        |
| 4.3 Influencia de los polimorfismos genéticos en las reacciones adversas          | 131        |
| <b>5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b>  | <b>134</b> |
| <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>136</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>140</b> |
| <b>AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN.....</b>  | <b>157</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>162</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Ejemplos de fármacos metabolizados por el CYP2D6.....   | <b>34</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Variantes alélicas del gen <i>CYP2D6</i> frecuentes en población caucásica.....   | <b>36</b> |
| <b>Tabla 3.</b> Variantes alélicas del CYP2D6 clasificados según su valor de actividad.....   | <b>36</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Diferentes fenotipos metabolizadores en función de su actividad enzimática calculada a partir de la suma de la actividad de los dos alelos..... | <b>37</b> |
| <b>Tabla 5.</b> Variantes alélicas de los genes de la subfamilia <i>CYP3A</i> frecuentes en población caucásica.....  | <b>41</b> |
| <b>Tabla 6.</b> Estudios con fecha de aprobación de la AEMPS y CEIC y fecha de realización.....   | <b>55</b> |
| <b>Tabla 7.</b> Diseño de los 6 ensayos clínicos de bioequivalencia de aripiprazol.....   | <b>57</b> |
| <b>Tabla 8.</b> Relación de genes y polimorfismos analizados relacionados con la farmacodinamia de aripiprazol.....   | <b>65</b> |
| <b>Tabla 9.</b> Relación de genes y polimorfismos analizados relacionados con la farmacocinética de aripiprazol.....  | <b>66</b> |
| <b>Tabla 10.</b> Información de las Sondas Taqman® empleadas para el estudio de cada polimorfismo.....  | <b>70</b> |
| <b>Tabla 11.</b> Condiciones de la PCR en el instrumento StepOnePlus™ según el ensayo empleado.....   | <b>71</b> |
| <b>Tabla 12.</b> Características demográficas de la población en estudio y diferencias según sexo.....  | <b>81</b> |
| <b>Tabla 13.</b> Frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados en la población de 148 voluntarios sanos.....  | <b>82</b> |
| <b>Tabla 14.</b> Frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados en nuestra población en comparación con las de otras poblaciones.....                     | <b>85</b> |
| <b>Tabla 15.</b> Frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados en la población de 148 voluntarios sanos según el sexo.....                            | <b>86</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 16.</b> Datos de biodisponibilidad y resultados del análisis de bioequivalencia de los 6 estudios realizados.....  | <b>89</b> |
| <b>Tabla 17.</b> Datos de biodisponibilidad y resultados del análisis de bioequivalencia de los comprimidos convencionales en comparación con los bucodispersables.....   | <b>90</b> |
| <b>Tabla 18.</b> Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol, dehidro-aripiprazol y la suma de ambos en la población estudiada.....  | <b>90</b> |
| <b>Tabla 19.</b> Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol con respecto al sexo.....   | <b>91</b> |
| <b>Tabla 20.</b> Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol y de la suma de aripiprazol y dehidro-aripiprazol con respecto al sexo.....                           | <b>92</b> |
| <b>Tabla 21.</b> Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol según el fenotipo del CYP2D6.....   | <b>92</b> |
| <b>Tabla 22.</b> Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol, de la suma de éste con aripiprazol y del ratio de ambos compuestos según el fenotipo del CYP2D6..... | <b>93</b> |
| <b>Tabla 23.</b> Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol según el genotipo del CYP3A4.....   | <b>94</b> |
| <b>Tabla 24.</b> Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol, de la suma de éste con aripiprazol y del ratio de ambos compuestos según el genotipo del CYP3A4..... | <b>94</b> |
| <b>Tabla 25.</b> Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol de acuerdo a los diferentes genotipos del CYP3A5.....   | <b>94</b> |
| <b>Tabla 26.</b> Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol, de la suma de éste con aripiprazol y del ratio de ambos compuestos según el genotipo del CYP3A5..... | <b>95</b> |
| <b>Tabla 27.</b> Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol de acuerdo a los diferentes genotipos de los 3 polimorfismos analizados en el gen ABCB1.....                  | <b>95</b> |
| <b>Tabla 28.</b> Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol, de la suma de éste con aripiprazol y del ratio de ambos compuestos según el genotipo del CYP3A5..... | <b>96</b> |
| <b>Tabla 29.</b> Coeficientes de regresión (B) múltiple del análisis farmacocinético.....   | <b>98</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabla 30.</b> Efecto de aripiprazol en la tensión arterial sistólica (TAS), tensión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardíaca (FC) e intervalo QT corregido (QTc).....      | <b>99</b>  |
| <b>Tabla 31.</b> Efecto de aripiprazol en la tensión arterial sistólica (TAS), tensión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardíaca (FC) e intervalo QT corregido (QTc).....      | <b>100</b> |
| <b>Tabla 32.</b> Parámetros cinéticos relacionados con la secreción de prolactina de acuerdo al fármaco analizado y sexo.....   | <b>103</b> |
| <b>Tabla 33.</b> Parámetros cinéticos relacionados con la secreción de prolactina durante el tratamiento con aripiprazol según el polimorfismo Taq1A (gen <i>DRD2</i> ) y sexo..... | <b>104</b> |
| <b>Tabla 34.</b> Incidencia y frecuencia de todas las RAM tanto individualmente como agrupadas de acuerdo a la clasificación SOC.....   | <b>105</b> |
| <b>Tabla 35.</b> Diferencias según sexo en la incidencia y frecuencia de todas las RAM tanto individualmente como agrupadas de acuerdo a la clasificación SOC.....                  | <b>106</b> |
| <b>Tabla 36.</b> Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de al menos una RAM con aripiprazol.....                  | <b>113</b> |
| <b>Tabla 37.</b> Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de náuseas/vómitos con aripiprazol.....                   | <b>113</b> |
| <b>Tabla 38.</b> Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de mareos con aripiprazol.....                            | <b>114</b> |
| <b>Tabla 39.</b> Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de RAM gastrointestinales con aripiprazol.....            | <b>114</b> |
| <b>Tabla 40.</b> Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de RAM neurológicas con aripiprazol.....                  | <b>115</b> |



|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 1.</b> Ejemplo de una curva dosis-respuesta de un fármaco.....  | <b>20</b>  |
| <b>Figura 2.</b> Ejemplo de una curva donde se representan los efectos del medicamentos en relación al tiempo transcurrido desde la administración.....   | <b>20</b>  |
| <b>Figura 3.</b> Procesos que regulan las diferencias en la respuesta farmacológica.....  | <b>21</b>  |
| <b>Figura 4.</b> Factores que contribuyen a la variabilidad en la respuesta farmacológica.....  | <b>22</b>  |
| <b>Figura 5.</b> Nomenclatura de la superfamilia del citocromo P450.....  | <b>23</b>  |
| <b>Figura 6.</b> Contenido relativo de las diferentes enzimas del CYP450 en el hígado con respecto al CYP450 total (Figura 6A) y porcentaje de fármacos metabolizados por dichas enzimas (Figura 6B)..... | <b>24</b>  |
| <b>Figura 7.</b> Estructura química y ruta metabólica de aripiprazol y de su metabolito activo, dehidro-aripiprazol.....  | <b>31</b>  |
| <b>Figura 8.</b> Estructura del locus de la subfamilia <i>CYP2D</i> .....   | <b>35</b>  |
| <b>Figura 9.</b> Diferentes fenotipos metabolizadores del CYP2D6 y sus consecuencias farmacoterapéuticas.....   | <b>38</b>  |
| <b>Figura 10.</b> Método de cuantificación de la concentración de prolactina.....   | <b>64</b>  |
| <b>Figura 11.</b> Fenómeno de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET).....   | <b>66</b>  |
| <b>Figura 12.</b> Ejemplo de genotipado mediante análisis de curvas de fusión.....  | <b>67</b>  |
| <b>Figura 13.</b> Fases de una PCR con la tecnología Taqman®.....   | <b>69</b>  |
| <b>Figura 14.</b> Ejemplo de los resultados de un experimento de genotipado mediante sondas Taqman.....   | <b>70</b>  |
| <b>Figura 15.</b> Ejemplo de diagrama donde se representa el número de copias obtenido para el gen <i>CYP2D6</i> con el software CopyCaller.....  | <b>72</b>  |
| <b>Figura 16.</b> Concentración de prolactina versus tiempo en la población femenina del estudio de aripiprazol en comparación con ibuprofeno.....  | <b>102</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 17.</b> Concentración de prolactina versus tiempo en la población masculina del estudio de aripiprazol en comparación con ibuprofeno.....  | <b>102</b> |
| <b>Figura 18.</b> Curvas ROC para el AUC y la $C_{max}$ para diferenciar sujetos con reacciones adversas.....  | <b>108</b> |
| <b>Figura 19.</b> Frecuencia del desarrollo de cualquier RAM según los diferentes genotipos del polimorfismo Taq1A (gen <i>DRD2</i> ) y -759C/T (gen <i>HTR2C</i> ).....                         | <b>109</b> |
| <b>Figura 20.</b> Frecuencia de RAM psiquiátricas según los diferentes genotipos del polimorfismo His452Tyr (gen <i>HTR2A</i> ).....   | <b>109</b> |
| <b>Figura 21.</b> Frecuencia de RAM de tipo general según los diferentes genotipos del polimorfismo G2677T/A y C1236T, ambos en el gen <i>ABCB1</i> .....  | <b>110</b> |
| <b>Figura 22.</b> Frecuencia de RAM neurológicas según los diferentes genotipos del polimorfismo T102C (gen <i>HTR2A</i> ) y frecuencia de mareos según los diferentes genotipos del CYP3A5..... | <b>110</b> |
| <b>Figura 23.</b> Frecuencia del desarrollo de náuseas/vómitos según los fenotipos del CYP2D6 y los genotipos del polimorfismo -759C/T (gen <i>HTR2C</i> ).....                                  | <b>111</b> |
| <b>Figura 24.</b> Frecuencia del desarrollo de RAM cardiovasculares según los diferentes genotipos del polimorfismo Taq1A (gen <i>DRD2</i> ).....  | <b>111</b> |

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>aa</b>              | Aminoácido   |
| <b>AA</b>              | Acontecimiento adverso   |
| <b>ABC</b>             | ATP-Binding Casette  |
| <b>ABCB1</b>           | ATP-Binding Cassette, Sub-Family B, Member 1   |
| <b>ADN</b>             | Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>AEMPS</b>           | Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios                                    |
| <b>ANOVA</b>           | Análisis de la varianza  |
| <b>ARI</b>             | Aripiprazol  |
| <b>ARN</b>             | Ácido ribonucleico   |
| <b>AUC</b>             | Área bajo la curva ( <i>"Area under the curve"</i> )                                       |
| <b>BHE</b>             | Barrera hematoencefálica   |
| <b>CEIC</b>            | Comité Ético de Investigación Clínica  |
| <b>CI</b>              | Intervalo de confianza   |
| <b>CI/F</b>            | Aclaramiento ajustado a biodisponibilidad  |
| <b>C<sub>max</sub></b> | Concentración máxima   |
| <b>CNV</b>             | Variaciones en el número de copias ( <i>"Copy Number Variations"</i> )                     |
| <b>Cp</b>              | Concentración plasmática del medicamento   |
| <b>CV</b>              | Coeficiente de variación   |
| <b>CYP</b>             | Citocromo P450   |
| <b>DHARI</b>           | Dehidro-aripiprazol  |
| <b>DRD2</b>            | Receptor de dopamina D <sub>2</sub>  |
| <b>DRD3</b>            | Receptor de dopamina D <sub>3</sub>  |
| <b>DS</b>              | Desviación estándar  |
| <b>EI</b>              | Estándar interno   |
| <b>ELISA</b>           | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"</i> ) |
| <b>EM</b>              | Metabolizadores rápidos o normales ( <i>"Extensive Metabolizers"</i> )                     |
| <b>EMA</b>             | Agencia Europea del Medicamento ( <i>"European Medicines Agency"</i> )                     |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>FC</b>            | Frecuencia cardíaca   |
| <b>FDA</b>           | Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos ( <i>"U.S Food and Drug Administration"</i> )  |
| <b>FRET</b>          | Transferencia de energía entre fluorocromos ( <i>"Förster resonance energy transfer"</i> )  |
| <b>HPLC-MS/MS</b>    | Cromatografía líquida de alta resolución en tándem con espectrofotometría de masas ( <i>"High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry"</i> ) |
| <b>HTR2A</b>         | Receptor de serotonina 2 <sub>A</sub>   |
| <b>HTR2C</b>         | Receptor de serotonina 2 <sub>C</sub>   |
| <b>IM</b>            | Intermediate metabolizers ( <i>"Intermediate Metabolizers"</i> )  |
| <b>IMC</b>           | Índice de masa corporal   |
| <b>Kb</b>            | Kilobase  |
| <b>K<sub>e</sub></b> | Constante de eliminación  |
| <b>LLOQ</b>          | Límite inferior de cuantificación ( <i>"Lower limit of quantification"</i> )  |
| <b>MDR-1</b>         | Multidrug Resistance Protein 1  |
| <b>MEC</b>           | Concentración eficaz mínima ( <i>"Minimum Effective Concentration"</i> )  |
| <b>ND</b>            | No disponible   |
| <b>OR</b>            | Odds Ratio  |
| <b>PCR</b>           | Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>"Polymerase chain reaction"</i> )  |
| <b>PM</b>            | Metabolizadores lentos ( <i>"Poor Metabolizers"</i> )   |
| <b>QTc</b>           | Intervalo QT corregido  |
| <b>RAM</b>           | Reacción adversa medicamentosa  |
| <b>ROC</b>           | Característica Operativa del Receptor ( <i>"Receiver Operating Characteristics"</i> )   |
| <b>rpm</b>           | Revoluciones por minuto   |
| <b>SLC</b>           | Transportador de solutos ( <i>"Solute Carrier"</i> )  |
| <b>SNC</b>           | Sistema Nervioso Central  |
| <b>SNP</b>           | Polimorfismo de nucleótido único ( <i>"Single Nucleotide Polymorphism"</i> )  |
| <b>SOC</b>           | Clasificación por grupos y sistemas ( <i>"System Organ Class"</i> )   |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>TAD</b>             | Tensión arterial diastólica   |
| <b>TAS</b>             | Tensión arterial sistólica  |
| <b>T<sub>max</sub></b> | Tiempo que tarda en alcanzarse la concentración máxima del fármaco  |
| <b>T<sub>1/2</sub></b> | Semivida de eliminación   |
| <b>UM</b>              | Metabolizadores ultra-rápidos ( <i>“Ultra-rapid Metabolizers”</i> ) |
| <b>V<sub>d</sub>/F</b> | Volumen de distribución ajustado a biodisponibilidad                |
| <b>χ<sup>2</sup></b>   | Prueba chi-cuadrado   |

# RESUMEN

---

El aripiprazol es un antipsicótico atípico empleado para el tratamiento de la esquizofrenia y del trastorno bipolar. Este fármaco actúa principalmente como antagonista de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> y como agonista parcial de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>. Se metaboliza en el hígado por las enzimas CYP2D6 y CYP3A4, implicadas también en la formación de su metabolito activo, dehidro-aripiprazol. Además, tanto aripiprazol como dehidro-aripiprazol son sustratos de la glicoproteína-p. Muchos de los pacientes en tratamiento con aripiprazol no responden de forma adecuada al mismo o sufren reacciones adversas. Esta gran variabilidad en el tratamiento podría estar causada por polimorfismos genéticos. Por tanto, el objetivo principal fue evaluar la influencia de determinados polimorfismos genéticos en la farmacocinética, farmacodinamia (tensión arterial, ECG y prolactina) y seguridad de aripiprazol y de su metabolito activo, así como la relación de las concentraciones plasmáticas de aripiprazol y su metabolito con la seguridad.

En este estudio se incluyeron 157 voluntarios sanos (89 hombres y 69 mujeres) que participaron en 6 ensayos clínicos de bioequivalencia con una dosis única de 10 mg de aripiprazol. Se analizaron 18 polimorfismos en los genes de las enzimas metabolizadoras del fármaco, de un transportador y de los principales receptores implicados en el mecanismo de acción del aripiprazol.

Las frecuencias alélicas de los genes analizados obtenidas en nuestra población fueron similares a las descritas en población caucásica.

El fenotipo de la enzima CYP2D6 demostró tener un papel clave en la farmacocinética de aripiprazol y de dehidro-aripiprazol. A medida que el número de alelos activos disminuyó, el AUC y la semivida de eliminación de aripiprazol fueron mayores mientras que el aclaramiento de aripiprazol y el AUC y la C<sub>max</sub> de dehidro-aripiprazol fueron menores. Otros polimorfismos como el C1236T (gen *ABCB1*) y el CYP3A5\*3 también influyeron en la farmacocinética aunque su efecto fue menor. Los sujetos homocigotos mutados T/T para el SNP C1236T presentaron menores valores de aclaramiento de aripiprazol y de AUC y C<sub>max</sub> de dehidro-aripiprazol. En los sujetos \*3/\*3 para el polimorfismo CYP3A5\*3 el ratio dehidro-aripiprazol/aripiprazol fue menor.

Además, las mujeres presentaron mayores valores de semivida y volumen de distribución y menores valores de AUC (ajustado dosis/peso) y  $C_{\max}$  (ajustado dosis/peso) de aripiprazol. La farmacocinética del metabolito activo no se vio afectada por el sexo.

El aripiprazol aumentó la frecuencia cardíaca y el intervalo QTc mientras que disminuyó la tensión arterial, estando todos estos parámetros farmacodinámicos influidos por el sexo. Los cambios en la tensión arterial y del intervalo QTc fueron dependientes de dos polimorfismos del gen que codifica el receptor de dopamina  $D_2$  (C957T y Taq1A, respectivamente).

Asimismo, el aripiprazol produjo un ligero aumento en los niveles de prolactina. Las concentraciones de prolactina fueron mayores en las mujeres y no estuvieron influenciadas por el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2*.

Un alto porcentaje de los sujetos sufrió reacciones adversas aunque la mayoría fueron de carácter leve. Las reacciones adversas fueron más comunes en las mujeres. El desarrollo de al menos una reacción adversa se vio influenciado por el AUC de aripiprazol y los polimorfismos genéticos *CYP3A5*\*3, Taq1A (*DRD2*), -759C/T (*HTR2C*) y T102C (*HTR2A*). El sexo y el AUC de aripiprazol se asociaron al desarrollo de náuseas y vómitos mientras que los mareos se asociaron con el sexo y el polimorfismo *CYP3A5*\*3.

En conclusión, la variabilidad interindividual observada durante el tratamiento con aripiprazol en nuestro estudio está causada, en gran medida, por polimorfismos genéticos. Los estudios farmacogenéticos en voluntarios sanos son una herramienta útil que genera una información valiosa acerca de la influencia que ejercen los polimorfismos genéticos en la farmacocinética, farmacodinamia y seguridad de los medicamentos. No obstante y para contribuir al correcto desarrollo de la medicina personalizada, estos estudios deben ser validados posteriormente en la población diana de pacientes que va a recibir el tratamiento a largo plazo.



# I. INTRODUCCIÓN

---



## **1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA A LOS FÁRMACOS**

La variabilidad en la respuesta a un medicamento sigue siendo en la actualidad uno de los mayores retos de la medicina. La mayoría de las veces un medicamento es eficaz en una amplia población de pacientes mientras que en otro grupo se va a producir un fallo terapéutico, bien por falta de eficacia o reacciones adversas medicamentosas (RAM). Las tasas de eficacia de los fármacos varían en gran medida entre los diferentes grupos de fármacos, situándose en torno al 80% en el grupo de los analgésicos, un 60% en los fármacos para la esquizofrenia y en torno al 30% para el Alzheimer (Spear et al. 2001). De hecho, entre un 20-75% de los pacientes no van a responder de manera satisfactoria al tratamiento.

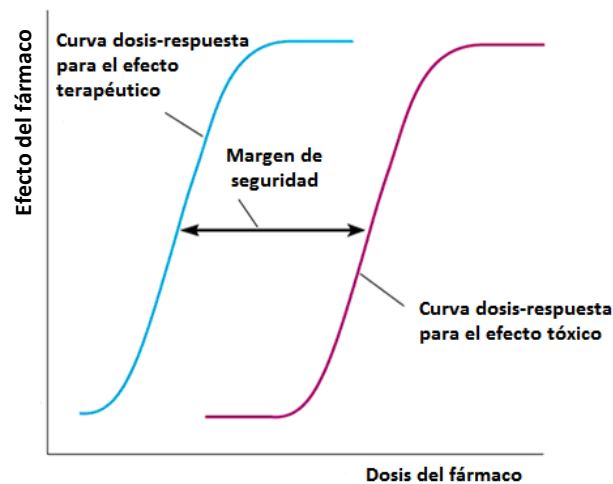
No sólo se encuentran diferencias interindividuales relativas a la eficacia si no también con respecto a la toxicidad, ya que la misma dosis del mismo medicamento puede causar reacciones adversas en un grupo determinado de pacientes mientras que en otros puede ser prácticamente inocuo (Zhou et al. 2008a). Se estima que las reacciones adversas son las causantes de un 4% de los ingresos hospitalarios en España y otros países (Garijo et al, 1991; Lazarou et al. 1998) y además, producen un importante incremento del gasto sanitario (tanto en costes directos como indirectos).

A pesar de que esta variabilidad interindividual en la respuesta a los medicamentos es de sobra conocida, la causa de la misma no está completamente establecida y es de gran importancia en el campo clínico y regulatorio, tanto en el desarrollo de nuevos medicamentos como en su posible retirada del mercado tras su comercialización (Ma et al. 2011).

### **1.1 Variaciones interindividuales en la respuesta al tratamiento**

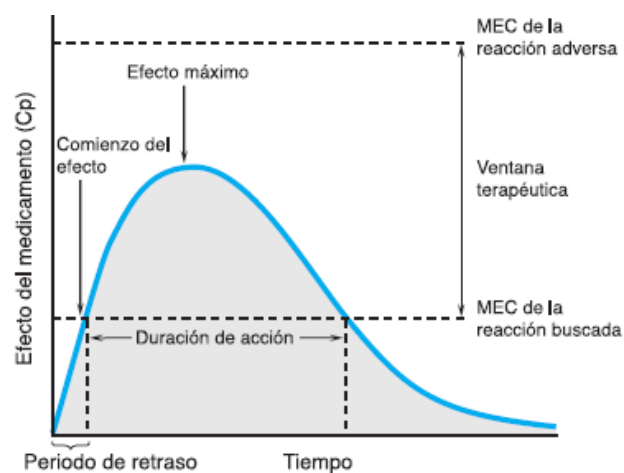
Para la mayoría de los medicamentos el régimen de dosis viene preestablecido en la ficha técnica y debería ser adecuado para todos los pacientes, sin embargo y como se ha visto previamente, no siempre ocurre así. En la práctica clínica la curva dosis-respuesta (figura 1) se emplea para determinar la dosis terapéutica (la que ejerce el efecto deseado) así como la dosis que puede producir toxicidad. Esta curva aporta información sobre la relación de la dosis del medicamento y el efecto farmacológico producido. En la mayoría de los casos una dosis mayor va a producir un mayor efecto terapéutico pero a la vez va a ser responsable de una mayor tasa de reacciones

adversas. La relación entre las concentraciones plasmáticas del medicamento y su efecto terapéutico y/o tóxico es una curva sigmoidea, es decir, a partir de un determinado nivel comenzarán a producirse los efectos, aumentando con el aumento de las concentraciones y llegando a un límite, en el cual, por mucho que se aumente la dosis no solo no habrá un aumento de eficacia, si no, que es más probable que aparezcan reacciones adversas.



**Figura 1.** Ejemplo de una curva dosis-respuesta de un fármaco.

Cuando se administra un medicamento sus efectos, en líneas generales, van a seguir un comportamiento característico (figura 2).

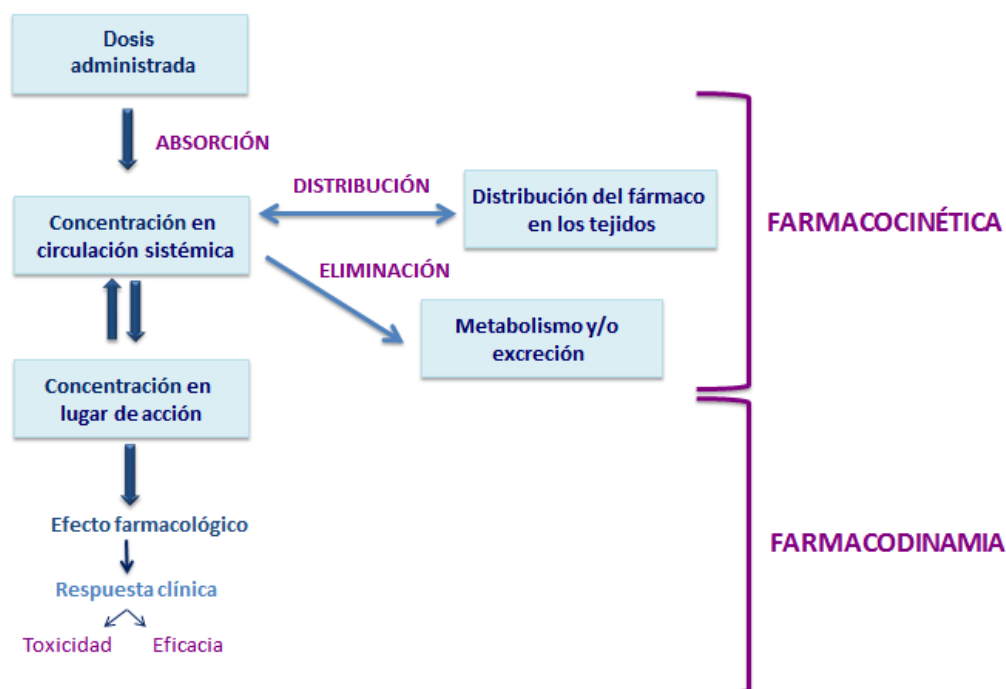


**Figura 2.** Ejemplo de una curva donde se representan los efectos del medicamento en relación al tiempo transcurrido desde la administración. Cp= concentración plasmática del medicamento; MEC= concentración eficaz mínima. Tomada de *Goodman and Gilman*, 2007.

En la práctica clínica se denomina “ventana terapéutica” al rango de concentración en el cual se va a producir el efecto terapéutico deseado en la mayoría de los pacientes sin producir efectos tóxicos relevantes en el organismo. El objetivo del tratamiento farmacológico es que las concentraciones plasmáticas del medicamento se encuentren dentro de dicha ventana, la cual va a estar comprendida entre la concentración eficaz mínima (MEC, del inglés *“Minimum effective concentration”*) para producir el efecto deseado y la MEC para producir la reacción adversa. Este intervalo va a variar entre pacientes, siendo más pronunciadas aún las diferencias en los fármacos de estrecho margen terapéutico, es decir, en aquellos en los que los niveles necesarios para que ejerza la acción y para que se produzca un efecto tóxico son muy próximos entre sí.

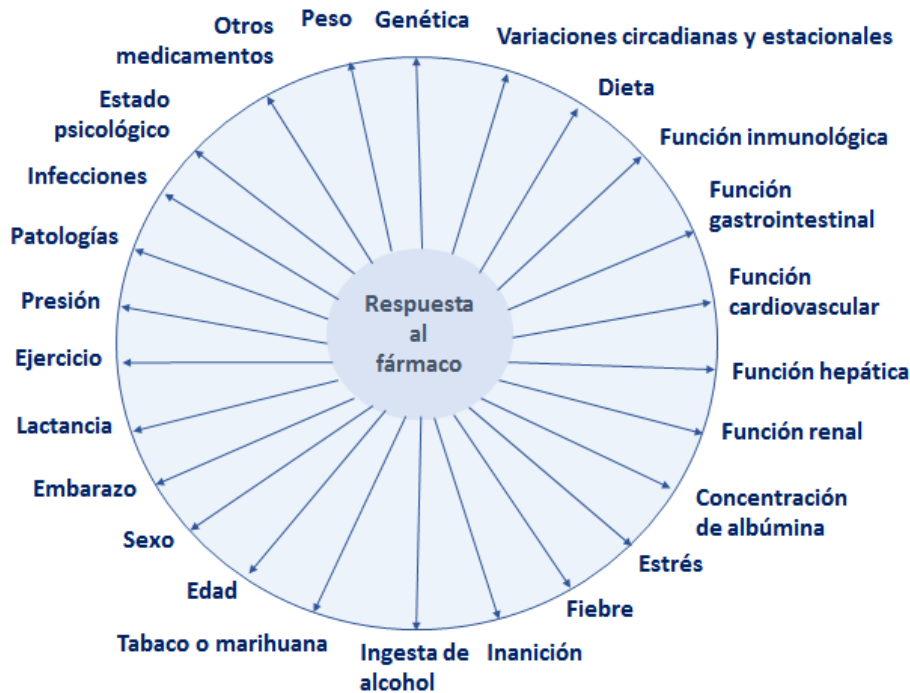
### 1.2 Factores que afectan a la respuesta farmacológica

Las diferencias interindividuales e intraindividuales en la respuesta al tratamiento pueden deberse tanto a procesos farmacocinéticos (proceso de absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco) como farmacodinámicos (interacción fármaco-receptor), tal y como se muestra en la figura 3.



**Figura 3.** Procesos que regulan las diferencias en la respuesta farmacológica.

Estos procesos van a estar influenciados por factores genéticos y no genéticos (figura 4). Dentro de los factores no genéticos se encuentran los ambientales (tratamientos concomitantes, tabaco...), fisiológicos (edad, peso, sexo y raza) y patológicos (disfunción hepática y renal).



**Figura 4.** Factores que contribuyen a la variabilidad en la respuesta farmacológica.

### 1.3 Farmacocinética

Cuando un fármaco penetra en el organismo se van a producir en el mismo una serie de procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos. La farmacocinética se encarga de estudiar los procesos que sufre el fármaco a través de su paso por el organismo. Mientras que la farmacodinamia estudia las acciones y efectos que ejerce el fármaco sobre el organismo.

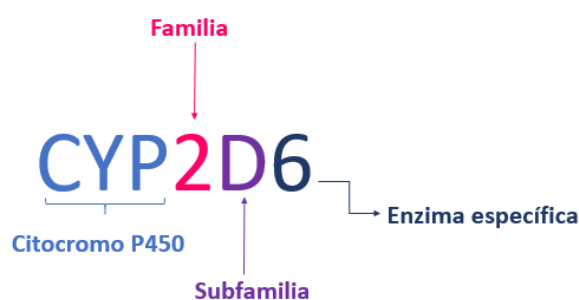
Dentro de los procesos que engloban la farmacocinética se encontrarían: absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco. En general, el proceso farmacocinético que está sujeto a una mayor variabilidad interindividual es el metabolismo, existiendo dos reacciones responsables del mismo:

- Reacciones de fase I: los fármacos son transformados en compuestos más solubles mediante reacciones de oxidación, hidrólisis o reducción. Normalmente son reacciones de inactivación que facilitan la eliminación renal o

hepática pero a veces pueden dar lugar a la formación de metabolitos activos. Son llevadas a cabo principalmente por la familia del citocromo P450 (CYP) (Madhusoodanan et al. 2014).

- Reacciones de fase II: consisten en procesos de conjugación en las cuales la solubilidad de los fármacos aumenta. Este tipo de reacciones son llevadas a cabo por enzimas tales como glucuroniltransferasas), N-acetiltransferasas, sulfoniltransferasas y glutathion S-transferasas.

El citocromo P450 es una familia de hemoproteínas que se encarga del metabolismo tanto de compuestos exógenos (fármacos, compuestos tóxicos) como endógenos (lípidos, hormonas...) (Madhusoodanan et al. 2014). Se localizan en prácticamente todo el organismo aunque su expresión es mayoritariamente hepática (Ding et al. 2003). La superfamilia del Citocromo P450 se clasifica de acuerdo a una nomenclatura basada en la homología de la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) (figura 5) que las codifica en: familias (con al menos un 40% de similitud en su secuencia de AA), subfamilias (con un 55% o más de similitud en su secuencia de AA) y enzimas individuales (se consideran diferentes cuando sus secuencias difieran en más de un 3%) (McGraw et al. 2012). Hasta la fecha se han descrito 18 familias y 44 subfamilias (Nelson et al. 2009).

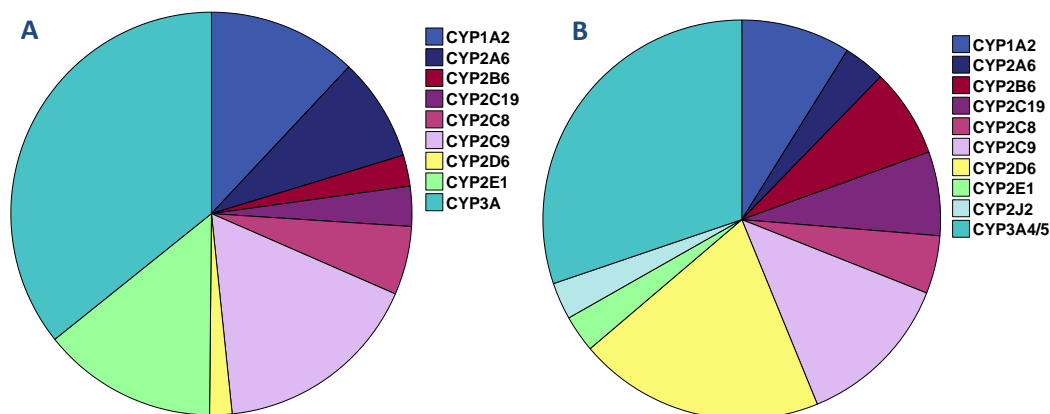


**Figura 5.** Nomenclatura de la superfamilia del citocromo P450.

Las familias 1, 2 y 3 son las responsables de la mayoría de las reacciones de biotransformación de fármacos.

Las isoenzimas CYP1A2, 2C8/9, 2C19, 2D6 Y 3A4/5 son las más importantes en el metabolismo de fármacos ya que se encargan de metabolizar aproximadamente el 90% de los medicamentos (McGraw et al. 2012). En el hígado la expresión de enzimas

metabolizadoras de fármacos va a suponer el 77% de su expresión total (figura 6). Hasta la fecha se han descrito 57 genes funcionales y 58 pseudogenes que se encargan de codificar estas insoenzimas (<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>).



**Figura 6.** Contenido relativo de las diferentes enzimas del CYP450 en el hígado con respecto al CYP450 total (Figura 6A) y porcentaje de fármacos metabolizados por dichas enzimas (Figura 6B). Figura 6A: datos de Yeo et al. 2004. Figura 6B: datos de Zanger et al. 2013.

Es importante también destacar el papel de los transportadores de membrana en la farmacocinética y por tanto, en la variabilidad en la respuesta a los fármacos. Los transportadores son proteínas de membrana que se encargan de la absorción y eliminación de sustancias endógenas y productos xenobióticos, entre los que se encuentran los fármacos (Dresser et al. 2001). Estos transportadores se encuentran principalmente a nivel hepático, renal y en el epitelio intestinal y van a tener un papel esencial en la absorción de los fármacos en el tracto gastrointestinal o en el paso al sistema nervioso central (SNC) a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Las dos superfamilias de transportadores más importantes son: los transportadores de membrana dependientes de ATP (ABC, del inglés *"ATP-Binding Casette"*) y el transportador de solutos (SLC, del inglés *"Solute Carrier"*) (International Transporter Consortium, 2010).



## 2. FARMACOGENÉTICA Y MEDICINA PERSONALIZADA

La Agencia Europea del Medicamento (EMA, del inglés *“European Medicines Agency”*) define la farmacogenética como el “estudio de las variaciones en la secuencia de ADN en relación a la respuesta farmacológica” (EMA, 2006) mientras que la farmacogenómica es considerada como el “estudio de las variaciones de las características del ADN y del ácido ribonucleico (ARN) en relación con la respuesta a fármacos” Por tanto, la farmacogenética se considera un subconjunto dentro de la farmacogenómica con un enfoque más clínico.

Con la aplicación de la farmacogenética en la práctica clínica habitual se pretende emplear la información genotípica del paciente para seleccionar el tratamiento más adecuado, realizar un buen ajuste de la dosis y/o prevenir la aparición de reacciones adversas (Daudén Tello et al. 2006). De esta manera se podría reducir el riesgo para los pacientes y se podría disminuir el periodo de tiempo que se tarda en dar con el fármaco adecuado y la dosis eficaz. En definitiva, el fin último de la farmacogenética es la consecución de la “medicina personalizada” o “medicina de precisión”, cambiando el modelo actual de “ensayo-error” donde para una determinada patología se prescribe el mismo tratamiento a todos los sujetos y se va modificando de acuerdo a la respuesta observada. La medicina personalizada reconoce que cada paciente es único y que no existe una respuesta uniforme al tratamiento. Por este motivo y mediante pruebas específicas, se puede predecir cómo va a responder un determinado paciente a un tratamiento y va a permitir que el clínico pueda escoger el tratamiento más adecuado para el sujeto así como la dosis y duración del mismo.

### 2.1 Variaciones genéticas

Un polimorfismo genético es una variación en la secuencia del ADN que aparece en más del 1% de la población, mientras que cuando su frecuencia es inferior se les denomina mutaciones.

Estas variaciones en la secuencia de ADN se clasifican de la siguiente manera:

- Polimorfismo de nucleótido único (SNP, del inglés *“Single Nucleotide Polymorphism”*), son aquellas variaciones en las que se sustituye una base de una secuencia del genoma por otra distinta. Son las más frecuentes ya que

constituyen el 90% de las variaciones genómicas humanas, apareciendo un SNP cada varias centenas a un millar de pares de bases (Stephens et al. 2001).

- Inserción o delección de una o más pares de bases en la secuencia del ADN, siendo las más frecuentes las de 1 a 3 pares de bases.
- Repeticiones en tándem: que a su vez se clasifican en microsatélites, minisatélites y satélites.
- Variaciones en el número de copias (CNVs, del inglés “*Copy Number Variations*”): segmento de ADN de 1 kilobase (kb) o mayor cuyo número de copias es variable si se compara con un genoma de referencia (Redon et al. 2006). En este apartado se englobarían las duplicaciones, multiplicaciones y delecciones de genes enteros.

Las consecuencias funcionales de estos polimorfismos van a depender de la localización de las variaciones en la secuencia de ADN.

Aquellos que se encuentren en regiones codificantes (exones) pueden ser de tipo sinónimo o no sinónimo.

- Los *SNP sinónimos* son aquellos en los que no se produce un cambio de AA pero que pueden tener consecuencias funcionales (afectando a la estabilidad del transcrito o al “*splicing*”).
- Los *SNP no sinónimos* sí que van a producir un cambio en la cadena de AA lo que puede afectar a la estabilidad y estructura de la proteína y su afinidad por los substratos. Dentro de esta categoría se encuentran:
  - Mutaciones de sentido erróneo o cambio de sentido (“*missense*”): se produce un codón que codifica para un AA diferente, pudiendo afectar a la funcionalidad de la proteína resultante. Sin embargo, no todas las mutaciones de este tipo van a producir consecuencias funcionales.
  - Mutaciones sin sentido (“*nonsense*”): se produce el cambio del codón original por un codón de parada, que va a producir una proteína truncada (normalmente inactiva).

Por otra parte, los SNP que se encuentren en regiones no codificantes (intrones) pueden afectar a procesos relacionados con la síntesis de la proteína (traducción).

También se pueden presentar en regiones reguladoras pudiendo afectar a la expresión de la proteína (Thompson & Thompson, 2007). Estas variaciones genéticas pueden afectar tanto a la farmacocinética como al efecto de los fármacos (farmacodinamia, eficacia y efectos adversos).

### **3. ESQUIZOFRENIA**

La esquizofrenia es un trastorno mental grave que se caracteriza por una alteración de la percepción, del pensamiento, de la conducta, así como por alteraciones cognitivas y de tipo emocional (Kaplan & Sadock's, 2010). Se considera que alrededor del 1% de la población mundial se encuentra afectada (Mueser et al. 2004).

Los síntomas se clasifican en cuatro grupos:

- Síntomas positivos: alucinaciones, delirios y conducta estafalaria.
- Síntomas negativos: alogia, abulia y anhedonia.
- Síntomas cognitivos: deterioro de memoria, atención y funciones cognitivas.
- Síntomas afectivos: ansiedad, depresión e ideas suicidas.

Para el diagnóstico de dicha enfermedad se emplea mayoritariamente el criterio DSM-V (del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) de la Asociación Americana de Psiquiatría (Diagnosis and statistical manual of mental disorders. 1994), que estipula que tienen que aparecer dos o más síntomas de los anteriormente citados durante 1 mes y que deben presentarse de forma continuada alteraciones ligadas a la esquizofrenia durante al menos 6 meses.

#### **3.1 Etiopatogenia**

Las causas de la esquizofrenia aún no están bien establecidas. Es una enfermedad multifactorial en la que influye la predisposición genética, el estrés ambiental y las condiciones psicosociales (Kane et al. 1996; Mueser et al. 2004). Existen diferentes teorías que relacionan una alteración a nivel neuroquímico con la esquizofrenia. La primera es la hipótesis dopaminérgica, que sostiene que un exceso de dopamina en la zona mesolímbica es la causante de los síntomas positivos, y por otro lado, sostiene que existe un déficit de dopamina en la zona mesocortical responsable de los síntomas negativos. Sin embargo, la hipótesis dopaminérgica no lograba dar una explicación

totalmente satisfactoria al origen de la esquizofrenia. Así, con el desarrollo de los antipsicóticos atípicos (antagonistas dopaminérgicos y además serotoninérgicos) surgió otra teoría, la teoría serotoninérgica, basada en la creencia de que una hiperactividad serotoninérgica podría ser la causante de la enfermedad. Por último, la hipótesis glutamatérgica postula que el origen de la enfermedad se debe a una hipofunción en receptores NMDA (Rang & Dale, 2012). Posiblemente ninguna de estas teorías sea totalmente cierta y la esquizofrenia se produzca por alteraciones en diferentes vías de neurotransmisión.

### **3.2 Tratamiento de la esquizofrenia**

La esquizofrenia es tratada principalmente con fármacos antipsicóticos, que se clasifican en dos grupos: típicos (también conocidos como de 1ª generación) y atípicos (2ª generación) (Flórez et al, 2008).

- Típicos: entre los que se encuentran clorpromazina, haloperidol y flufenazina. Éstos son solo eficaces en los síntomas positivos. Actúan como antagonistas dopaminérgicos y producen mayoritariamente reacciones adversas de tipo extrapiramidal.
- Atípicos: como clozapina, risperidona, quetiapina, olanzapina y aripiprazol. Actúan como antagonistas dopaminérgicos y serotoninérgicos. Son efectivos tanto en síntomas positivos como negativos. Las principales reacciones adversas que producen son aumento de peso y síndromes metabólicos (hipercolesterolemia, hiperglucemia, etc...).

Sin embargo, el tratamiento de la esquizofrenia con fármacos antipsicóticos está aún lejos de ser completamente satisfactorio y presenta una serie de inconvenientes importantes (Gesteira et al. 2010):

- Su eficacia es aproximadamente del 60%. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que hasta un 40% de los pacientes son resistentes al tratamiento (Weiss et al. 1999).
- Produce reacciones adversas graves y frecuentes lo que provoca incumplimiento terapéutico que va a condicionar recaídas y un aumento de la mortalidad. Se estima que la tasa de abandono terapéutico es de alrededor de

un 74% y está producida tanto por la falta de eficacia como por las reacciones adversas derivadas del mismo (Lieberman et al. 2005).

- El periodo de optimización de la dosis mediante el método ensayo-error es demasiado largo (meses e incluso, años) debido a la estrecha ventana terapéutica de los antipsicóticos.
- La esquizofrenia presenta una alta prevalencia por lo que supone un elevado coste sanitario y la falta de adherencia al tratamiento va a provocar un incremento mayor aún en los costes (tanto directos como indirectos). En total la esquizofrenia supone en España un coste en torno a los 2500 millones de euros al año (Oliva-Moreno et al. 2009).

Estas características convierten a los antipsicóticos en candidatos idóneos para la realización de pruebas farmacogenéticas.

#### 4. ARIPIPAZOL

El fármaco en estudio es el aripiprazol, un antipsicótico atípico derivado de quinolonas y que está indicado para el tratamiento de la esquizofrenia, así como para el tratamiento y la prevención de los episodios maníacos del trastorno bipolar (Ficha técnica Abilify®, EMA). Para la esquizofrenia la dosis de inicio recomendada es de 10-15 mg/día (dosis de mantenimiento: 15 mg/día), mientras que para los episodios maníacos es de 15 mg/día (Ficha técnica Abilify®, EMA).

##### 4.1 Mecanismo de acción

Debido a su mecanismo de acción (que difiere del resto de antipsicóticos típicos y atípicos), aripiprazol es clasificado por algunos autores como un antipsicótico de tercera generación (Sayyaparaju et al, 2014; Di Sciascio et al, 2015), también denominada como “estabilizadores del sistema dopamina-serotonina” (Burris et al. 2002; Jordan et al. 2002). El aripiprazol actúa como antagonista de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> (propiedad que comparte con el resto de antipsicóticos atípicos) y 5-HT<sub>7</sub> (Raully-Lestienne et al. 2007), y como agonista parcial de los receptores de dopamina D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, aunque para este último receptor su afinidad es bastante moderada (Burris et al. 2002; Jordan et al. 2002; Shapiro et al. 2003). Además, también tiene cierta afinidad como antagonista de

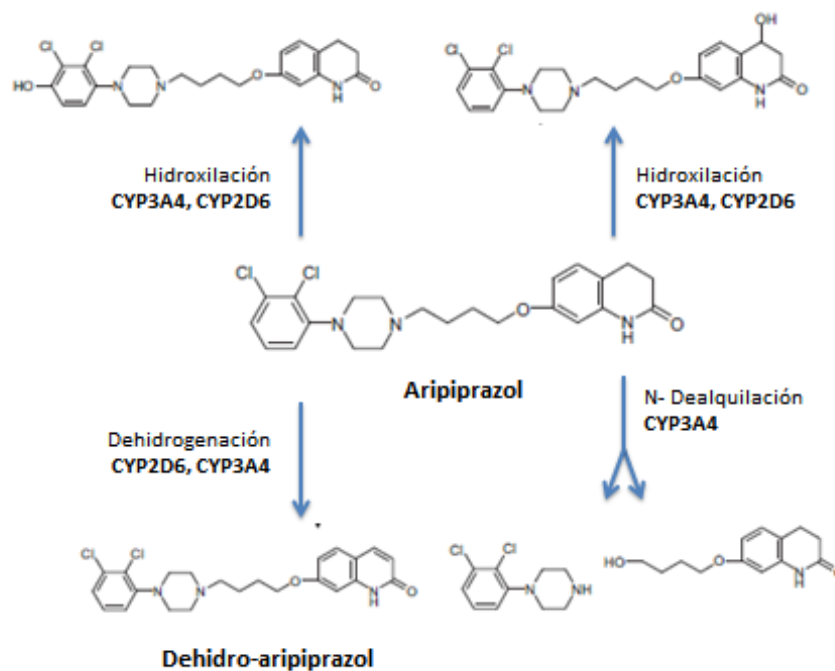
receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e histaminérgicos  $H_1$  (Patteet et al. 2012; Goodnick et al. 2002). El hecho de ser agonista parcial dopaminérgico implica que cuando existen altos niveles de dopamina, se va a comportar como un antagonista, mientras que cuando existen bajos niveles de dicho neurotransmisor va a actuar como agonista, aumentando o normalizando el efecto de la dopamina (Tamminga et al. 2002; Di Sciascio et al. 2015). Debido a sus propiedades como agonista parcial va a reducir la transmisión dopaminérgica y/o serotoninérgica cuando sean excesivas y las va a aumentar o mantener cuando haya un déficit de las mismas (Stahl 2001a; Stahl 2001b). Por lo tanto, va a producir la reducción de la hiperactividad dopaminérgica en la zona mesolímbica que está implicada en la psicosis y al mismo tiempo va a restaurar dicha actividad dopaminérgica en la zona cortical que media los síntomas negativos y cognitivos y las zonas que regulan los movimientos motores y la secreción de prolactina (Stahl 2001a; Stahl 2001b). Los antipsicóticos convencionales son antagonistas dopaminérgicos y consecuentemente producen un bloqueo de los receptores dopaminérgicos resultando en una disminución de la actividad dopaminérgica post-sináptica (Kapur et al. 2000) que estaría incrementada en los pacientes esquizofrénicos. Mientras que el aripiprazol, al ser un agonista parcial, va a reducir la hiperactividad dopaminérgica sin crear un estado de hipodopaminergia.

Este perfil farmacológico único entraña la ventaja de que el efecto farmacológico producido va a estar en perfecto equilibrio: ni demasiada ni deficiente estimulación de los receptores mencionados anteriormente, por lo que va a producir una disminución en los síntomas negativos y cognitivos sin producir altas tasas de efectos adversos tales como síntomas extrapiramidales, aumento de los niveles de prolactina o aumento de peso, que son causantes de la falta de adherencia al tratamiento con antipsicóticos.

### 4.2 Farmacocinética

El aripiprazol presenta una farmacocinética lineal en el rango de dosis de 5 a 30 mg/día (Mallikaarjun et al. 2004). La biodisponibilidad oral absoluta de aripiprazol es del 87%, no viéndose alterada la misma por las comidas. Alcanza su concentración máxima ( $C_{max}$ ) entre las 3 y 5 h posteriores a la administración (Mallikaarjun et al. 2004). Su volumen de distribución es de aproximadamente 4,9 L/kg por lo que cabría esperar una gran distribución extravascular (Ficha técnica Abilify®, EMA). El estado estacionario

se alcanza tras 14 días de tratamiento (Ficha técnica Abilify®, EMA). Tanto aripiprazol como su metabolito tienen una alta tasa de unión a proteínas plasmáticas (>99%), especialmente a albúmina (Citrome et al. 2007). Se metaboliza principalmente en el hígado por enzimas del citocromo P450 (CYP), el CYP2D6 y el CYP3A4, sufriendo reacciones de dehidrogenación (implicados el CYP2D6 y el CYP3A4), hidroxilación (CYP3A4 y CYP2D6) y N-dealquilación (CYP3A4) (McGavin et al. 2002) (figura 7).



**Figura 7.** Estructura química y ruta metabólica de aripiprazol y de su metabolito activo, dehidro-aripiprazol.

A partir de la reacción de dehidrogenación se forma su metabolito activo (dehidro-aripiprazol). Tanto el CYP2D6 como el CYP3A4 están implicados en la formación y eliminación del metabolito (Swainston et al. 2004), aunque un estudio realizado en voluntarios sanos pone de manifiesto que el CYP3A4 podría tener un papel más importante en el metabolismo del dehidro-aripiprazol (Kubo et al. 2005). Este metabolito representa alrededor del 40% de los niveles totales de fármaco en plasma en el equilibrio estacionario (Citrome et al. 2005) y parece tener propiedades farmacológicas similares al aripiprazol (Tadori et al. 2011), incluso hay autores que postulan que podría ser más potente (Wood et al. 2006), mientras otros autores creen que su afinidad por receptores D2 es similar (Swainston et al. 2004).

La semivida de eliminación ( $T_{1/2}$ ) de aripiprazol es de 75 h mientras que para el dehidro-aripiprazol es de 94 h. Este parámetro farmacocinético se ve afectado por el fenotipo del CYP2D6 llegando a las 146 h en los metabolizadores lentos (PM) en el caso de aripiprazol. El aclaramiento de aripiprazol se produce principalmente en el hígado y es de 0,7 ml/min/kg. La  $T_{max}$  del metabolito se produce en torno a las 70 horas posteriores a la administración, siendo su eliminación más lenta que la de aripiprazol (Kubo et al. 2007).

La farmacocinética de aripiprazol no se ve afectada significativamente por características poblacionales tales como edad, peso y sexo (Kim et al. 2008) ni tampoco por el tabaco, enfermedad renal o la raza (Ficha técnica Abilify®, EMA), por lo que no se requiere ajuste de dosis en ninguno de estos casos. Sin embargo, ante una misma dosis administrada los niveles plasmáticos de aripiprazol y dehidroaripiprazol presentan una gran variabilidad interindividual (Kim et al. 2008 (a); Kirschbaum et al. 2008; Lin et al. 2011), siendo mayor la de éste último (Molden et al. 2006).

### 4.3 Perfil de seguridad

Las reacciones adversas más comunes recogidas en la ficha técnica de aripiprazol (incidencia >3% de los pacientes) son: acatisia y náuseas. Otras reacciones adversas producidas por este fármaco son agitación, insomnio, ansiedad, síntomas extrapiramidales, somnolencia, dolor de cabeza, visión borrosa, vómitos, estreñimiento, taquicardia e hipotensión postural. Sin embargo, comparado con otros antipsicóticos (tanto típicos como atípicos) el perfil de seguridad de aripiprazol es bastante más favorable, ya que sus tasas de síntomas extrapiramidales, aumento de peso o hiperprolactinemia son menores (Mallikaarjun et al. 2004; Pigott et al. 2003). Además, los efectos adversos relacionados suelen ser de intensidad leve a moderada y por lo general, se desarrollan al inicio del tratamiento (Mallikaarjun et al. 2004).

Su perfil de efectos adversos cardiovasculares aún no está bien establecido. Su influencia sobre el intervalo QT corregido (QTc) del electrocardiograma es contradictoria, ya que a pesar de que parece no tener implicación en la prolongación de dicho intervalo (Polcwiartek et al. 2015; Suzuki et al. 2011a; Pigott et al. 2003), se han notificado casos de prolongación del QTc después del tratamiento con aripiprazol (Hategan et al. 2014; Suzuki et al. 2011b). Además, no existen en la bibliografía



estudios “*Thorough QT/QTc*” con aripiprazol, cuyo fin es estudiar si un fármaco es capaz de prolongar el intervalo QTc. Comparado con otros fármacos de su misma familia como la pimozida, haloperidol, ziprasidona o clozapina el riesgo de producir un aumento en el QTc es bastante más bajo (Mallikaarjun et al. 2004; Gulisano et al. 2011; Drici et al. 2007; Muench et al. 2010). La influencia del aripiprazol sobre la frecuencia cardíaca (FC) y la presión arterial tampoco está bien establecida (Citrome et al. 2007; Marcus et al. 2009).

## 5. ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS PREVIOS CON ARIPIPAZOL

En la actualidad, no existe una prueba farmacogenética relacionada con el tratamiento con antipsicóticos que se aplique en la práctica clínica habitual, a pesar de que la Food and Drug Administration (FDA) incluye al aripiprazol en su “*Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling*” (<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>). Esta tabla proporciona información sobre los fármacos que incluyen en su ficha técnica información relativa a la farmacogenética (en la actualidad incluye más de 200 correlaciones gen-fármaco), sin embargo, en la mayoría de los fármacos enumerados no se dispone de guías sobre cómo aplicar la información proporcionada (Amur et al. 2008). En torno al 22% de los fármacos citados son metabolizados por el CYP2D6. En el caso de aripiprazol la ficha técnica recomienda el genotipado del gen *CYP2D6*, reduciéndose la dosis inicial en los sujetos PM en un 50% con respecto a la dosis habitual de inicio.

El estudio farmacogenético de aripiprazol es hasta ahora más escaso comparado con otros antipsicóticos debido a su comercialización más reciente. En los estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha se han evaluado principalmente polimorfismos de las enzimas metabolizadoras y de los receptores sobre los que actúa dicho fármaco.

### 5.1 Genes relacionados con la farmacocinética de aripiprazol

#### 5.1.1 CYP2D6:

La enzima CYP2D6 es una de las enzimas pertenecientes al complejo del citocromo P450. Está formada por 497 aminoácidos (AA) y se expresa principalmente en hígado, aunque también lo hace en otras zonas como el cerebro (Stingl et al. 2013). A pesar de que su expresión en hígado es baja (en torno al 2% del contenido total en CYPs), es una

de las enzimas más importantes en el metabolismo de fase I de fármacos, ya que metaboliza alrededor de un 20-25% de los fármacos prescritos en la práctica clínica habitual, tales como antipsicóticos, antidepresivos y  $\beta$ -bloqueantes, entre otros (tabla 1) (Ingelman-Sundberg et al. 2004; Zhou et al. 2009; Zanger et al. 2004).

**Tabla 1.** Ejemplos de fármacos metabolizados por el CYP2D6.

| Antipsicóticos | Antidepresivos | B-bloqueantes | Oncológicos | Otros           |
|----------------|----------------|---------------|-------------|-----------------|
| Aripiprazol    | Amitriptilina  | Bisoprolol    | Tamoxifeno  | Anfetaminas     |
| Haloperidol    | Clomipramina   | Carvedilol    | Ondansetrón | Codeína         |
| Olanzapina     | Desimipramina  | Metoprolol    | Dolasetrón  | Dextrometorfano |
| Perfenazina    | Fluoxetina     | Propanolol    |             | Fentanilo       |
| Risperidona    | Paroxetina     | Timolol       |             | Metoclopramida  |
| Tioridazina    | Trazodona      |               |             | Oxicodona       |
| Zuclopentixol  | Venlafaxina    |               |             | Tramadol        |

La expresión de dicha enzima no está regulada por ningún factor ambiental y los inductores como la rifampicina tienen poco impacto (Eichelbaum et al. 1986), sin embargo, sí que puede ser inhibida por fármacos como el bupropion, la fluoxetina o la quinidina (Flockhart, 2007).

Esta enzima no solo tiene un papel importante en el metabolismo de fármacos, sino que también se ha hipotetizado un posible papel modulador del sistema serotoninérgico a través de la regeneración de serotonina desde 5-metoxitriptamina, pudiendo estar implicada en la enfermedad mental (Yu et al. 2003; Ozdemir et al. 2006).

El gen que lo codifica recibe el mismo nombre y se encuentra en el brazo largo del cromosoma 22, más concretamente en la posición 22q13.1 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Está formado por 4383 pares de bases que se agrupan en un total de 9 exones y 8 intrones (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2D6>) (figura 8). Este gen se expande en una región de 45 kb, con dos pseudogenes cercanos, *CYP2D7* y *CYP2D8*, con un 97% y un 92% de similitud en su secuencia (Heim, et al. 1992).



**Figura 8.** Estructura del locus de la subfamilia *CYP2D*. Se muestran los dos pseudogenes y el gen *CYP2D6*. REP 7 y REP6 corresponden a segmentos repetitivos de secuencia similar.

Se trata de un gen altamente polimórfico del cual se han descrito más de 150 variantes alélicas (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>) (Arneth et al. 2009), entre las que se encuentran:

- Polimorfismos de base única (SNPs): \*4, \*7.
- Inserciones o deleciones de una o más bases nitrogenadas: \*3, \*6 y \*9.
- Inserciones del pseudogen: \*13.
- Delección completa del gen: \*5.
- Duplicaciones/multiplicaciones de alelos tanto activos (\*1xN) como inactivos (\*4xN).

Dentro de los dos últimos apartados (deleciones y duplicaciones/multiplicaciones) se englobarían los CNVs definidos previamente. Existen más de 20.000 CNVs identificados y están asociados con enfermedades autoinmunes, cáncer y metabolismo de fármacos. En el caso del gen *CYP2D6* condicionan los fenotipos metabolizadores por lo que conocer el número de copias del gen nos aporta una información genética muy valiosa ya que nos va a permitir hacer una asignación del fenotipo metabolizador mucho más precisa.

Las diferentes variantes en este gen van a dar lugar a proteínas con diferentes grados de actividad (tabla 2) y van a ser las causantes de parte de la variabilidad en el metabolismo de los fármacos que sean sustratos del CYP2D6.

**Tabla 2.** Variantes alélicas del gen *CYP2D6* frecuentes en población caucásica. Adaptado de “The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database” (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>).

| Alelo       | Cambios en nucleótidos       | Efecto                                 | Actividad enzima |
|-------------|------------------------------|--|------------------|
| <b>*1</b>   | Ninguno ( <i>wild type</i> ) | Ninguno                                | Normal           |
| <b>*3</b>   | 2549delA                     | Cambio en el marco de lectura (aa 259) | Nula             |
| <b>*4</b>   | 1846G>A                      | Defecto de splicing                    | Nula             |
| <b>*5</b>   | Delección completa gen       | Delección completa gen                 | No hay enzima    |
| <b>*6</b>   | 1707delT                     | Cambio en el marco de lectura (aa 118) | Nula             |
| <b>*7</b>   | 2935A>C                      | Cambio de sentido                      | Nula             |
| <b>*9</b>   | 2613_2615delAGA              | Delección aa                           | Disminuida       |
|             | 2615_2617delAAG              | Delección aa                           | Disminuida       |
| <b>*1xN</b> |                              | Duplicación/multiplicación gen         | Incrementada     |
| <b>*4xN</b> |                              | Duplicación/multiplicación gen mutado  | Nula             |

**Abreviaturas:** N=número de copias; A=adenina; G=guanina; C=citosina; T=timina; del=delección; aa=aminoácido.

A partir del genotipo de un determinado sujeto vamos a poder realizar una estimación de su fenotipo metabolizador mediante el criterio de Gaedigk y colaboradores (Gaedigk et al. 2008.). A cada uno de los dos alelos posibles se le asigna un valor numérico en función de la actividad de la proteína que codifican, como se refleja en la tabla 3. La suma del valor de los alelos de un genotipo nos dará un valor de índice de actividad que se traducirá en un determinado fenotipo metabolizador del CYP2D6 (tabla 4).

**Tabla 3.** Variantes alélicas del CYP2D6 clasificados según su valor de actividad

| Valor del alelo | Alelo   |
|-----------------|---|
| <b>0</b>        | *3, *4, *4xN, *5, *6, *7, *8, *11, *14 <sup>a</sup> , *14B, *15, *16, *19, *20, *36, *40, *42, *56B |
| <b>0,5</b>      | *9, *10, *17, *29, *41  |
| <b>1</b>        | *1, *2, *35, *10xN, *17xN, *41xN  |
| <b>2</b>        | *1xN, *2xN, *35xN   |

**Tabla 4.** Diferentes fenotipos metabolizadores en función de su actividad enzimática calculada a partir de la suma de la actividad de los dos alelos

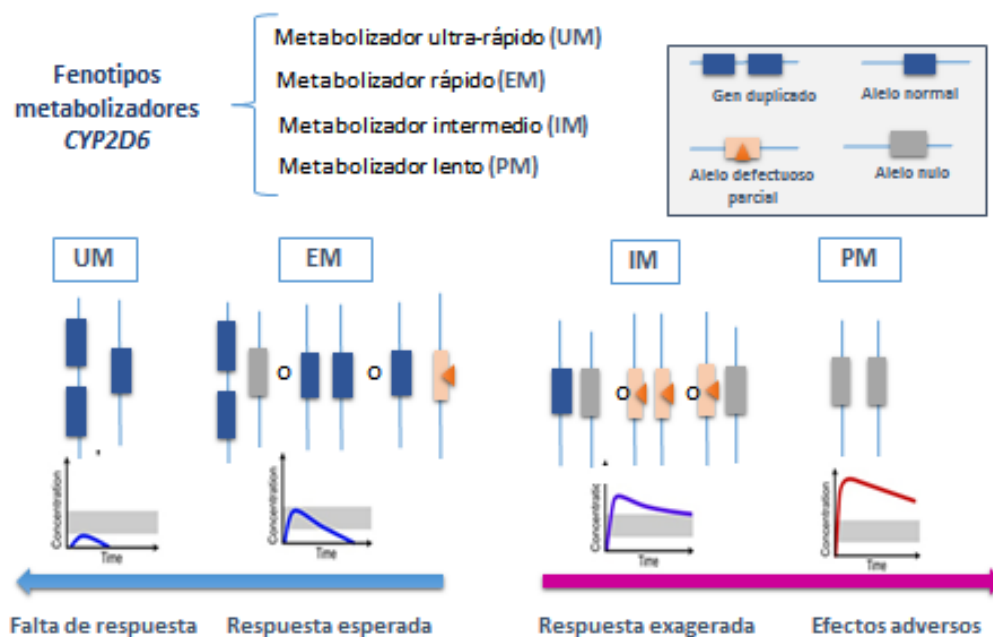
| Actividad enzimática | Fenotipo metabolizador             |
|----------------------|------------------------------------|
| 0                    | Metabolizador lento (PM)           |
| 0,5-1                | Metabolizador intermedio (IM)      |
| 1,5-2                | Metabolizador normal o rápido (EM) |
| >2                   | Metabolizador ultra-rápido (UM)    |

Los fenotipos metabolizadores del CYP2D6 se clasifican en cuatro grupos (figura 9):

- **Metabolizadores ultra-rápidos (UM, del inglés “Ultra-rapid Metabolizers”):** son aquellos que presentan más de dos copias activas del gen. Van a tener una alta capacidad metabólica por lo que no van a alcanzar concentraciones terapéuticas y es probable que se produzca una falta de respuesta al tratamiento.
- **Metabolizadores rápidos o normales (EM, del inglés “Extensive metabolizers”):** son aquellos que presentan dos alelos activos, la combinación de uno activo con uno parcialmente defectuoso o la de un alelo nulo junto con una duplicación. Alcanzarán concentraciones terapéuticas y tendrán por tanto una buena respuesta al tratamiento.
- **Metabolizadores intermedios (IM, del inglés “Intermediate metabolizers”):** en esta categoría se engloban aquellos sujetos que presentan la combinación de dos alelos parciales defectuosos, de uno defectuoso parcial más uno nulo o bien, los que presentan uno activo más uno nulo. Su capacidad metabólica estará reducida por lo que las concentraciones del fármaco serán ligeramente superiores lo que puede predisponerlos a una mayor respuesta terapéutica pero también a una mayor tasa de RAM. Esta categoría sigue generando controversia ya que parece que su interés es más “experimental” que fenotípico ya que parece ser difícil de distinguir entre IM y EM.
- **Metabolizadores lentos (PM, del inglés “Poor metabolizers”):** son aquellos sujetos que van a presentar dos alelos nulos o bien aquellos que tengan el gen completamente delecionado (sujetos con el genotipo \*5\*/5). Su capacidad metabólica va a ser prácticamente nula por lo que en su organismo se acumularán grandes concentraciones del fármaco durante un periodo de

tiempo largo lo que los va a predisponer a una mayor frecuencia de reacciones adversas (Ingelman-Sundberg et al. 1999).

Las consecuencias clínicas del fenotipo metabolizador dependerán del fármaco, lo expuesto anteriormente aplicaría a fármacos activos, pero en el caso de profármacos que tienen que ser transformados a fármacos activos, el panorama sería justo el contrario. En el caso de la codeína la cual es convertida en su forma activa, la morfina, por el CYP2D6, en los UM podría producirse una sobreexposición a la morfina con el aumento del riesgo de toxicidad y por el contrario en los PM se produciría una falta de eficacia.



**Figura 9.** Diferentes fenotipos metabolizadores del CYP2D6 y sus consecuencias farmacoterapéuticas.

Además de ser un gen altamente polimórfico, el *CYP2D6* presenta una gran variabilidad interétnica. La mayor frecuencia de UM ha sido descrita en las poblaciones de Etiopía (hasta 30%), Oriente Medio (20%) y región Mediterránea (7-10%). Se cree que esto puede estar causado por la selección natural debido a la propiedad del CYP2D6 para detoxificar alcaloides (presentes en las toxinas de algunas plantas), por lo que en estas poblaciones que tenían que buscar recursos alimenticios alternativos, se favoreció la supervivencia de aquellos sujetos con más de 2 copias del gen *CYP2D6*, es decir, los sujetos UM (Ingelman-Sundberg, et al. 2005). En cuanto a los PM, la

frecuencia es mayor en la población caucásica (6-10%), seguida de la afroamericana (2-5%) y siendo bastante inferior en la asiática (aproximadamente 1%). En la población caucásica los alelos \*3, \*4, \*5 y \*6 son los responsables de 93-97% de los PMs (Sachse et al. 1997). En España el porcentaje de PMs es inferior a la media europea (en torno al 5%), mientras que se estima que entre el 7 y el 10% de los españoles son UMs (Agúndez et al. 1995), porcentaje bastante superior a otras poblaciones caucásicas como la sueca donde es del 1% (Steiner et al. 1988). Estas diferencias fenotípicas podrían estar causadas por la conquista árabe en el Mediterráneo.

Un estudio realizado en pacientes demostró que las concentraciones de aripiprazol y de la suma de aripiprazol y dehidro-aripiprazol se ven afectadas por los genotipos del *CYP2D6*, siendo un 60% mayor la exposición a la suma de aripiprazol y dehidro-aripiprazol en los sujetos PM en comparación con los EMs (Hendset et al. 2007). A pesar de existir varios estudios que muestran el efecto del genotipo/fenotipo del *CYP2D6* en la farmacocinética de aripiprazol, esos mismos estudios no consiguieron demostrar el efecto de dicho gen en las concentraciones del metabolito activo (Kim et al. 2008a; Hendset et al. 2007; Suzuki et al. 2014).

### 5.1.2 CYP3A4:

Junto con el *CYP3A5*, es la forma predominante en el hígado humano (entre ambas suponen aproximadamente un 35% del contenido total en CYPs, aunque el *CYP3A5* es la forma minoritaria) (Yeo et al. 2004). Se estima que metaboliza alrededor de un 30% de los fármacos empleados en la práctica clínica (Zanger et al. 2013). El gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 7, en la posición 7q21.1. (<http://www.omim.org/entry/124010>). Aun siendo menos polimórfico que el *CYP2D6*, este gen presenta más de 40 variantes alélicas (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>). La expresión y la actividad de la enzima puede verse afectada tanto por factores ambientales (sexo, edad, terapia concomitante...) como genéticos (Ozdemir et al. 2000). Esta variabilidad está causada en gran medida por su facilidad para ser inducida e inhibida. Entre los inductores del *CYP3A4* encontramos agentes antirretrovirales (efavirenz y nevirapina), antiepilépticos (fenitoína, carbamazepina) y la rifampicina, mientras que son inhibidores del mismo también agentes antirretrovirales (ritonavir y saquinavir), macrólidos (eritromicina y

claritromicina) y antifúngicos (ketoconazol, itraconazol y voriconazol) (Flockhart, 2007).

Por otra parte, las variables genéticas identificadas hasta la fecha no han demostrado tener un papel importante sobre dicha variabilidad. Este escaso valor predictivo puede venir dado en cierta parte por las bajas frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados y por la ausencia de una asociación claramente establecida con un fenotipo alterado (Elens et al. 2013). Una de las variantes alélicas pertenecientes a este gen es el polimorfismo *CYP3A4*\*20 (rs67666821), que produce una proteína no funcional debido a un cambio en el marco de lectura (Westlind-Johnsson et al. 2006). Se trata de una variante poco común (presente en menos del 0.06% de la población caucásica), sin embargo, en la población española presenta una frecuencia relativamente alta, aproximadamente del 1,2% (llegando hasta el 3,8% en determinadas regiones) lo que es compatible con un efecto fundador en nuestra población (Apellániz-Ruiz et al. 2015). Los sujetos portadores de esta variante van a presentar mayores niveles plasmáticos de un determinado fármaco ya que no metabolizan correctamente el fármaco (Westlind-Johnsson et al. 2006). Hasta ahora, no hay estudios que se centren en la influencia de dicho polimorfismo sobre la farmacocinética de aripiprazol.

Otra variante alélica que ha sido recientemente descrita es la *CYP3A4*\*22 (rs35599367), un SNP localizado en el intron 6 que está relacionado con una disminución en la expresión de ARNm, y por tanto, dará lugar a una enzima de actividad reducida (Wang et al. 2011). La frecuencia de esta variante alélica en la población caucásica varía entre el 4 y 7% (Elens et al. 2013). Mientras que un estudio realizado con quetiapina (van der Weide et al. 2014) demostró mayores niveles del fármaco en los portadores de dicha variante, los resultados de otro estudio realizado por el mismo grupo con aripiprazol (van der Weide et al. 2015) no fueron capaces de mostrar dicha asociación.

### 5.1.3 CYP3A5:

Al igual que el *CYP3A4*, se expresa principalmente en hígado e intestino (Kolars et al. 1994). El gen que codifica esta enzima se encuentra localizado en el cromosoma 7, más



concretamente en la posición 7q22.1, junto con otros miembros de la familia CYP3A como el CYP3A4 (<https://www.pharmgkb.org/gene/PA131?tabType=tabVip>).

CYP3A4 y CYP3A5 comparten gran homología en sus secuencias, por lo que tienen una especificidad por sustratos similares, debido a esto algunos fármacos metabolizados por el CYP3A4, como es el caso de aripiprazol, también son en parte metabolizados por el CYP3A5 (Huang et al. 2004). Este hecho nos lleva a pensar que la farmacocinética de estos compuestos podría verse alterada por los polimorfismos del CYP3A5 (Kuehl et al. 2001). CYP3A5 es un gen bastante polimórfico, con 26 variantes alélicas descritas (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5>). La variante no funcional más comúnmente descrita hasta la fecha es CYP3A5\*3 (rs776746) cuya frecuencia en la población española es del 91% (Gervasini et al. 2005; Sinues et al. 2007) y produce un defecto en el “*splicing*” (proceso de corte y empalme del ARNm) dando lugar a una proteína no funcional (Kuehl et al. 2001). Los sujetos con genotipo \*3/\*3 no van a expresar el CYP3A5, por lo que es de esperar que vayan a presentar mayores concentraciones de aripiprazol debido a su nula capacidad de metabolismo (Lamba et al. 2012; Suzuki et al. 2014). Hasta ahora, los estudios que han analizado la influencia de este polimorfismo sobre el metabolismo de aripiprazol han arrojado resultados negativos (Kim et al. 2008a; Suzuki et al. 2014).

En la tabla 5 se resume información relativa a las variantes analizadas de la subfamilia CYP3A.

**Tabla 5.** Variantes alélicas de los genes de la subfamilia CYP3A frecuentes en población caucásica. Adaptado de “The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database” (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>) y (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5>).

| Alelo            | Cambios en nucleótidos | Efecto                            | Actividad enzima |
|------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------|
| <b>CYP3A5*3</b>  | 6986A>G                | Defecto de splicing               | Nula             |
| <b>CYP3A4*20</b> | 25889_25890insA        | Cambio en el marco de lectura 488 | Nula             |
| <b>CYP3A4*22</b> | 15389C>T               | Sin datos disponibles             | Disminuida       |

#### 5.1.4 Glicoproteína P:

Es un transportador que se encuentra tanto en la BHE (actuando como “bomba de expulsión” regulando la entrada y acúmulo de fármacos en el SNC) como en el tracto gastrointestinal (donde actúa de manera similar, influyendo en la farmacocinética de los fármacos) (Zhou et al. 2008b). El gen que la codifica se denomina *ABCB1* (del inglés ATP-Binding Cassette, Sub-Family B, Member 1) también conocido como *MDR-1* (del inglés Multidrug Resistance Protein 1) (Gunes et al. 2008; Yoshimori et al. 2015). Este gen se encuentra en el cromosoma 7 (Fromm et al. 2002), en la posición 7q21.12 ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000085563;r=7:87503633-87713323](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000085563;r=7:87503633-87713323)). Uno de los polimorfismos más estudiados hasta la fecha es el C3435T (rs1045642), un SNP en el exón 26 que parece tener un papel relevante en la expresión y función de la glicoproteína-P. En un estudio realizado en voluntarios sanos (Hoffmeyer et al. 2000) se observó que aquellos sujetos cuyo genotipo era T/T tenían una menor expresión duodenal de *ABCB1* lo que da lugar a mayores niveles plasmáticos de fármacos, en este caso, de digoxina. En estudios realizados en ratones *knock-out* para el gen *ABCB1* se ha observado que tanto aripiprazol como su metabolito son sustratos de la glicoproteína-P (Wang et al. 2009; Kirschbaum et al. 2010), sin embargo, parece que este SNP no influye en la farmacocinética de aripiprazol, aunque sí que puede tener un papel importante en la regulación de la entrada de aripiprazol y dehidro-aripiprazol en el SNC a través de la BHE (Wang et al. 2009; Kirschbaum et al. 2010). Más recientemente un estudio realizado en pacientes japoneses mostró una falta de correlación entre dicho polimorfismo y los niveles de aripiprazol y dehidro-aripiprazol (Suzuki et al. 2014). Hasta la fecha la información existente sobre la influencia del C3435T en la farmacocinética de los medicamentos es bastante contradictoria ya que mientras algunos autores afirman que en los sujetos con genotipo mutado T/T existe una menor expresión duodenal de la glicoproteína-P que da lugar a mayores concentraciones de fármaco (Hoffmeyer et al. 2000) otros autores afirman justo lo contrario (Sakaeda et al 2001). Además, se han descrito otros dos SNPs (C1236T y G2677T/A) que han demostrado tener influencia en la respuesta al tratamiento con antipsicóticos tales como la clozapina, haloperidol y risperidona (Vijayan et al. 2012). Sin embargo, en el estudio de Suzuki (Suzuki et al. 2014) la

farmacocinética de aripiprazol no se vio afectada por el polimorfismo G2677T/A mientras que el efecto del C1236T sobre el aripiprazol no ha sido estudiado hasta la fecha.

## 5.2 Genes relacionados con la farmacodinamia de aripiprazol

Los receptores de dopamina y de serotonina son las principales dianas del aripiprazol por lo que se espera que variaciones en los genes que los codifican puedan ejercer influencia en la respuesta al tratamiento, la farmacodinamia y las reacciones adversas durante el tratamiento con aripiprazol.

### 5.2.1 Receptores de dopamina

#### ❖ **Gen *DRD2***

Es el gen que codifica el receptor de dopamina D<sub>2</sub>; que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11, en la posición 11q23.2 ([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000149295;r=11:113409615-113475691](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000149295;r=11:113409615-113475691); Grandy et al. 1989). En relación con los antipsicóticos se han estudiado principalmente dos SNP: Taq1A (rs1800497) y C957T (rs6277).

El polimorfismo Taq1A es una variación genética no sinónima de tipo “*missense*” (cambio de sentido), el alelo mutado (A1) se ha relacionado con una disminución en la expresión del gen *DRD2* que hace que disminuya la actividad dopaminérgica en el SNC. Tanto estudios in vitro como in vivo han demostrado una disminución del 40% en la densidad de receptores D<sub>2</sub> en el estriado (Thompson et al. 1997; Pohjalainen et al. 1998). Esta variante se ha asociado con una mayor respuesta al tratamiento con antipsicóticos, entre los que se encuentra el aripiprazol (Kim et al. 2008b; Kwon et al. 2008; Shen et al. 2009), así como con una mayor tasa de efectos adversos (Suzuki et al. 2000).

Además, esta variante ha sido previamente asociada con un aumento en los niveles de prolactina con otros antipsicóticos como clozapina, olanzapina y risperidona tanto en voluntarios sanos como en pacientes (López-Rodríguez et al. 2011; Young et al. 2004). Sin embargo, el único estudio realizado con aripiprazol no fue capaz de replicar esta asociación (Nagai et al. 2012).

El polimorfismo C957T es una variante sinónima que altera la estabilidad del ARNm, dando lugar a una disminución de la expresión del receptor de dopamina D<sub>2</sub> en los sujetos portadores del alelo mutado T (Duan et al. 2003), en los que se ha observado una mayor respuesta al tratamiento con aripiprazol (Shen et al. 2009).

### ❖ Gen *DRD3*

Este gen se encuentra en el cromosoma 3 (3q13.31) y se encarga de codificar el receptor de dopamina D<sub>3</sub> (Chen et al. 2009a). En relación con el tratamiento con antipsicóticos se ha estudiado el SNP Ser9Gly (rs6280), que es una variación no sinónima con cambio de sentido. Se ha observado que los sujetos homocigotos mutados (Gly/Gly) presentan mayor respuesta al tratamiento con clozapina y risperidona (Scharfetter et al. 1999; Lane et al. 2005) así como con otros antipsicóticos atípicos (Vehof et al. 2012) lo que puede estar relacionado con su mayor afinidad de unión a dopamina in vitro (Lundstrom et al. 1996). Esta mayor afinidad también se ha relacionado con un aumento del riesgo de desarrollo de reacciones adversas tales como síntomas extrapiramidales (Lerer et al. 2002). Sólo existe un estudio realizado con aripiprazol en el que los sujetos Ser/Ser presentaban una mayor probabilidad de no responder al tratamiento (aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas), datos que concuerdan con lo mencionado anteriormente (Chen et al. 2009a).

#### 5.2.2 Receptores de serotonina

### ❖ Gen *HTR2A*

Este gen se encuentra en el cromosoma 13 (posición 13q14.2) y se encarga de codificar el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2A</sub>. Apenas existen estudios que evalúen el papel de este polimorfismo sobre aripiprazol pero sí el de otros antipsicóticos. Se han estudiado principalmente dos polimorfismos, el T102C (rs6313) y el His452Tyr (rs6314), aunque arrojando resultados contradictorios hasta la fecha. El SNP T102C es una variante sinónima mientras que el His452Tyr es una variante no sinónima con cambio de sentido.

Estudios realizados con olanzapina (Olajossy-Hilkesberger et al. 2011) y risperidona (Kim et al. 2008c) encontraron asociación entre el alelo C del polimorfismo T102C y

una mayor respuesta al tratamiento, mientras que un meta-análisis realizado con clozapina (Arranz et al. 1998a) encontró la asociación contraria, es decir, un mayor porcentaje de fallos terapéuticos en los portadores de dicho alelo. El único estudio realizado con aripiprazol (Chen et al. 2009b) también encontró asociación entre el alelo C y una menor respuesta al tratamiento (únicamente en relación a los síntomas negativos). Además, también se asoció el alelo T con un mayor riesgo de reacciones adversas en el tratamiento con olanzapina (Ujike et al. 2008) y risperidona (López-Rodríguez et al. 2013).

En los sujetos homocigotos para el alelo His del polimorfismo His452Tyr se ha observado una mayor respuesta al tratamiento con clozapina (Arranz et al. 1998b) y con olanzapina (Olajossy-Hilkesberger et al. 2011; Blasi et al. 2015). Hasta ahora, no hay estudios del efecto de este polimorfismo sobre el aripiprazol.

### ❖ Gen *HTR2C*

Este gen se encuentra en el cromosoma X (posición Xq23) y codifica para el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2C</sub>. Uno de los polimorfismos más estudiados es el -759C/T (rs3813929), se trata de una variante funcional que altera las interacciones entre el ADN y proteínas (Hill et al. 2011). El alelo T forma una única y débil interacción mientras que el C forma 3 complejos. Estas diferencias en la unión a factores de transcripción pueden llevar a diferencias en la expresión génica, siendo posible que una disminución en la expresión conlleve a una menor susceptibilidad al aumento de peso relacionado con los antipsicóticos (Hill et al. 2011). En estudios previos con olanzapina se vio que el alelo T tiene un papel protector frente al aumento de peso (Ellingrod et al. 2005). En otro estudio también con olanzapina, se demostró que el alelo C promovía un aumento del riesgo de obesidad y por lo tanto, de diabetes y enfermedades cardiovasculares, que son una de las principales reacciones adversas y causas de muerte en el tratamiento con antipsicóticos atípicos (Mulder et al. 2007).

## 6. IMPLEMENTACIÓN DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Como se ha mostrado a lo largo de las secciones anteriores la variabilidad individual en el tratamiento farmacológico es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la práctica clínica en la actualidad. A pesar de los numerosos ejemplos de la utilidad de

los test farmacogenéticos en la predicción de reacciones adversas o en el ajuste de dosis, la realidad sobre su verdadera aplicación dista mucho de la situación ideal. Algunos ejemplos de estas pruebas son:

- **HLA-B\*5701 y abacavir:** en los sujetos portadores de este alelo el abacavir no está recomendado debido a una alta probabilidad de reacciones de hipersensibilidad (Mallal et al. 2002). Se recomienda el genotipado previo en cualquier paciente antes de empezar con el tratamiento (Martin et al. 2014).
- **VKORC1, CYP2C9 y warfarina:** el alelo -1639G>A de *VKORC1* y los alelos \*2 y \*3 del *CYP2C9* se han asociado con un incremento del riesgo de sangrado en pacientes en tratamiento con este anticoagulante así como unos requerimientos de dosis más bajos. *VKORC1* junto con *CYP2C9* han demostrado ser responsables de un 40% en la variabilidad del tratamiento con warfarina. Se han propuesto diferentes algoritmos, considerándose factores genéticos y no genéticos, para ajustar la dosis de inicio del tratamiento (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, 2009).

Se pueden seguir dos enfoques en la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica:

- **Modelo caso a caso:** la solicitud de la prueba genética se realiza de manera individualizada y está basada en la necesidad de utilizar un fármaco cuya respuesta está influida por una o más variaciones genéticas conocidas. Un ejemplo sería la determinación del alelo HLA-B\*5701 para el tratamiento con abacavir (Aceti et al. 2015). Una ventaja de este enfoque es que la información obtenida va a ser empleada junto con el resto de características del paciente para la elección del tratamiento. Sin embargo, al realizarse de manera “individualizada” el coste será mayor así como el tiempo de entrega de resultados.
- **Modelo de genotipado anticipado:** la información genética se va a obtener al comienzo y por tanto, estará disponible cuando el clínico tenga que seleccionar el tratamiento para el paciente (Johnson et al. 2012). El auge de la tecnología genómica permite que esta estrategia se lleve a cabo con un coste relativamente bajo y de forma rápida mediante el desarrollo de “arrays” que

permiten la detección simultánea de cientos de variantes en un gran número de genes. Actualmente se están llevando a cabo diversos proyectos con el objetivo de demostrar la utilidad del genotipado anticipado en la práctica clínica como el proyecto eMERGE-PGx en Estados Unidos (Rasmussen-Torvik et al. 2014).

En el caso de los genes que codifican para enzimas metabolizadoras, la relevancia de un polimorfismo genético va a depender de varios factores (Stingl et al. 2015):

- Debe tener un gran impacto en la actividad de la enzima metabolizadora, a este tipo de polimorfismos se les podría clasificar como “polimorfismo de alto grado” como sería el caso de la enzima CYP2D6 hasta “polimorfismo de bajo grado” en aquellos casos en los que las variaciones genéticas no explican las variaciones en la respuesta farmacológica, donde se podría englobar al CYP3A4.
- La afinidad del fármaco por la enzima debe ser alta.
- La enzima debe englobar la principal vía metabólica en la eliminación o activación de al menos el 30% del fármaco.
- El rango terapéutico debe ser bastante estrecho por lo que desviaciones en los niveles del fármaco puedan tener implicaciones clínicas.

### 6.1 ¿Puede funcionar realmente la medicina personalizada?

Para que la medicina personalizada funcione es necesario, en primer lugar, entender la patogénesis de la enfermedad, identificar los genes que son responsables de la misma y el papel que ejercen los diferentes polimorfismos en enzimas metabolizadoras, transportadores y dianas farmacológicas. Para la aplicación de la farmacogenética en la práctica clínica habitual deberían cumplirse las siguientes características:

- Que la enfermedad a la que esté enfocada el tratamiento sea grave, incapacitante o prevalente.
- Que la prueba farmacogenética sea coste-efectiva.
- Que la tecnología existente sea adecuada, fiable y eficiente en el tiempo.
- Que existan terapias alternativas a ese fármaco en concreto.

- Que los clínicos estén concienciados de la utilidad de dichas pruebas y sepan cómo aplicar los conocimientos derivados de las mismas en su práctica clínica diaria. En la mayoría de los casos, los prescriptores prefieren seguir aplicando el método “ensayo-error” u otras variables como la insuficiencia hepática o renal a la hora de iniciar o ajustar un tratamiento.

El objetivo es establecer asociaciones fenotipo/genotipo mediante el uso de test farmacogenéticos que revelen la predisposición del fármaco a curar de forma eficaz la enfermedad y/o el desarrollo de reacciones adversas medicamentosas. Son, por tanto, necesarios ensayos clínicos prospectivos que evalúen tanto la utilidad como el coste-efectividad de la farmacogenética.

Los test farmacogenéticos pueden ser de gran utilidad cuando un paciente presenta concentraciones plasmáticas anormales de un fármaco, cuando no responde al tratamiento o bien desarrolla reacciones adversas. Pero no sólo en estas situaciones pueden ser de utilidad, también se pueden emplear en pacientes de edad avanzada o polimedicados donde los fenotipos UM/EM pueden derivar en IM/PM a causa de una inhibición enzimática debida a la terapia concomitante (Laine et al. 2001).

## 7. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento con aripiprazol presenta una eficacia que está aún lejos de ser satisfactoria y da lugar a una alta tasa de reacciones adversas. Además, tanto la eficacia como la seguridad varían ampliamente entre individuos.

Esta variabilidad interindividual puede deberse en parte a la genética, por lo que nos planteamos investigar el papel de los polimorfismos de las enzimas metabolizadoras, un transportador y receptores sobre la farmacocinética, farmacodinamia y perfil de seguridad del aripiprazol.

Mediante el ajuste de las dosis terapéuticas en base al fenotipo del paciente se estima que se podría producir una considerable mejora en la eficacia de los fármacos (15%) así como en el perfil de seguridad (10-20% disminución de las reacciones adversas) (Ingelman-Sundberg et al. 2004). Sin embargo, esta situación “ideal” está lejos de ser una realidad ya que actualmente aún existe la necesidad de demostrar la utilidad clínica y farmacoeconómica de la farmacogenética.



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## **1. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Existen determinados marcadores farmacogenéticos que podrían estar implicados en la farmacocinética, farmacodinamia y perfil de reacciones adversas de los fármacos antipsicóticos atípicos y en concreto, del aripiprazol.

Si conocemos a fondo la farmacogenética del aripiprazol podremos predecir qué pacientes van a responder mejor al tratamiento y cuáles tienen mayor riesgo de desarrollar efectos adversos. Además, la farmacogenética permitiría producir una disminución del gasto sanitario debido a una menor tasa de efectos adversos, menos ingresos hospitalarios por reacciones adversas, menos tratamientos para dichas reacciones adversas y reducción de la duración del ingreso (si el tratamiento es más eficaz).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la influencia de determinados marcadores farmacogenéticos en la farmacocinética, farmacodinamia y perfil de reacciones adversas de aripiprazol.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1.** Describir las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los genes relacionados con la farmacocinética (*CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1*) y de los receptores implicados en la farmacodinamia (*DRD2*, *DRD3*, *HTR2A*, *HTR2C*) de aripiprazol en una población de voluntarios sanos.
- 2.** Determinar la influencia que tienen los polimorfismos de enzimas metabolizadoras (*CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*) y de un transportador de fármacos (*ABCB1*) en la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol y de dehidro-aripiprazol.
- 3.** Evaluar la relación de los distintos polimorfismos con el desarrollo de reacciones adversas producidas por la administración del aripiprazol.
- 4.** Evaluar el efecto que ejercen las concentraciones plasmáticas de aripiprazol y de dehidro-aripiprazol sobre el desarrollo de reacciones adversas.

5. Estudiar la influencia de aripiprazol y de dehidro-aripiprazol en los parámetros electrocardiográficos (QTc y frecuencia cardíaca) y en la tensión arterial.
6. Analizar el papel que ejercen los polimorfismos genéticos de los receptores (*DRD2*, *DRD3*, *HTR2A*, *HTR2C*) en los parámetros electrocardiográficos (QTc y frecuencia cardíaca) y en la tensión arterial.
7. Estudiar el efecto del tratamiento con aripiprazol en los niveles de prolactina así como el papel que ejerce el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* sobre los mismos.
8. Analizar el efecto del sexo sobre la farmacocinética, farmacodinamia y seguridad de aripiprazol.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. POBLACIÓN ESTUDIADA

En este estudio se incluyeron 157 voluntarios sanos que participaron en un total de 6 ensayos clínicos de bioequivalencia con aripiprazol realizados en la Unidad de Ensayos Clínicos del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa entre los años 2012 y 2014. Estos ensayos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del mismo hospital y por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y se llevaron a cabo bajo las normas de Buena Práctica Clínica (tabla 6). En todos ellos la Investigadora Principal fue la Dra. Dolores Ochoa Mazarro, Facultativo Especialista del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa.

**Tabla 6.** Estudios con fecha de aprobación de la AEMPS y CEIC y fecha de realización.

| Ensayo | Fecha de aprobación CEIC | Fecha de aprobación AEMPS | Fecha de realización     |
|--------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ARI-1  | 06/06/2012               | 17/07/2012                | Julio-Septiembre/2012    |
| ARI-2  | 03/08/2012               | 08/10/2012                | Noviembre-Diciembre/2012 |
| ARI-3  | 10/10/2012               | 15/11/2012                | Enero-Febrero/2013       |
| ARI-4  | 18/12/2012               | 12/03/2013                | Abril-Junio/2013         |
| ARI-5  | 27/06/2013               | 25/07/2013                | Agosto-Octubre/2013      |
| ARI-6  | 07/11/2013               | 20/02/2014                | Febrero-Mayo/2014        |

Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el ensayo clínico, mientras que para el estudio farmacogenético dieron su consentimiento informado un total de 148 sujetos.

Para participar en el estudio los sujetos debían de cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- Haber dado su consentimiento informado.
- Tener una edad comprendida entre 18 y 55 años.
- Estar libres de cualquier patología ya sea orgánica o psíquica.
- Historia clínica y examen físico normal.
- No presentar alteraciones clínicamente relevantes en análisis hematológico, bioquímico, serológico y urinario.
- Signos vitales y electrocardiograma dentro de la normalidad.

Por otra parte, los sujetos que cumplían los siguientes criterios de exclusión fueron eliminados durante el periodo de reclutamiento y por tanto, no incluidos en el ensayo clínico:

- Sujetos que padecían una patología orgánica o psíquica.
- Haber recibido tratamiento farmacológico de prescripción médica en los últimos 15 días o cualquier clase de medicamento en las 48 horas antes de recibir la medicación en estudio. Únicamente se permitieron los anticonceptivos hormonales en el caso de mujeres en edad fértil.
- Tener un índice de masa corporal (IMC) fuera del rango de 18,5-30,0 kg/m<sup>2</sup>.
- Historia de hipersensibilidad a cualquier medicamento.
- Ser fumador o dar positivo en test de drogas de abuso.
- Ser consumidor diario de alcohol y/o haber sufrido intoxicación aguda de alcohol en la última semana.
- Haber donado sangre en el último mes.
- Estar embarazada o en periodo de lactancia.
- Haber participado en otro estudio con medicamentos en fase de investigación en los 3 meses anteriores (1 mes si el fármaco estaba comercializado en España).
- Ser intolerante a la lactosa.

## 2. DISEÑO DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS

Los 6 ensayos clínicos que se incluyen en el presente trabajo fueron ensayos clínicos de bioequivalencia. Los ensayos de bioequivalencia tienen como objetivo obtener datos farmacocinéticos de las formulaciones en estudio (fármaco test frente al fármaco referencia, es decir, el que ya se encuentra comercializado) para demostrar que éstas son equivalentes entre sí con el fin de poder comercializar el fármaco test como Equivalente Farmacéutico Genérico (EFG). En el primer periodo, cada voluntario recibió una dosis de 10 mg de aripiprazol de una de las formulaciones (ya sea el fármaco test o referencia) y tras un periodo de lavado de 4 semanas, recibió la misma dosis de la otra formulación en el segundo periodo. En la mitad de los ensayos clínicos la forma farmacéutica empleada fueron comprimidos convencionales (no recubiertos)



mientras que en la otra mitad fueron comprimidos bucodispersables. En los ensayos clínicos en los que la formulación fueron comprimidos convencionales la medicación se administró con 240 mL de agua y en el caso de los comprimidos bucodispersables, los sujetos tomaron 20 mL de agua previos a la administración para humedecer la lengua y posteriormente el comprimido fue colocado en la lengua hasta su completa disolución. En ambos casos todos los sujetos recibieron la medicación con un ayuno previo de 10 h y posterior de 5 h.

Todos los ensayos clínicos tuvieron un diseño común: fase I, abiertos, cruzados, aleatorizados y con una dosis única de 10 mg de aripiprazol por vía oral. Todos tenían 2 secuencias y 2 periodos. La asignación del tratamiento (test/referencia o referencia/test) se realizó al azar en bloques balanceados de 4-6 sujetos. Únicamente fueron ciegos para el laboratorio externo acreditado que se encargó de determinar las concentraciones plasmáticas de aripiprazol. Las características principales de cada estudio se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Diseño de los 6 ensayos clínicos de bioequivalencia de aripiprazol.

| Ensayo   | ARI-1   | ARI-2  | ARI-3  | ARI-4  | ARI-5  | ARI-6  |
|--|---|--|--|--|--|--|
| <b>Formulación*</b>                              | C.C   | C.B  | C.C  | C.B  | C.C  | C.B  |
| <b>Dosis (mg)</b>                                | 10  | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   |
| <b>Tiempos de muestreo (h)</b>                   | 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.33, 3.67, 4, 4.33, 4.67, 5, 5.5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 y 72 | 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.33, 3.67, 4, 4.33, 4.67, 5, 5.5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 y 72 | 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48 y 72 | 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.33, 3.67, 4, 4.33, 4.67, 5, 5.5, 6, 7, 8, 12, 24, 48 y 72 | 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48 y 72 | 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48 y 72 |
| <b>Periodo de lavado (días)</b>                  | 28  | 28   | 28   | 28   | 28   | 28   |
| <b>Individuos genotipados/ Individuos ensayo</b> | 22/24   | 22/24  | 29/30  | 36/36  | 27/30  | 35/36  |

Abreviaturas: \*C.C: comprimidos convencionales. C.B: comprimidos bucodispersables.

### 3. MÉTODO ANALÍTICO

#### 3.1 Extracción y procesamiento de las muestras

A cada uno de los voluntarios se le extrajo una muestra de sangre en un tubo de 6 mL que contiene EDTA (BD Vacutainer®, USA) como anticoagulante a los diferentes tiempos de extracción que figuran en la tabla 6. Para la obtención del plasma las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm (1900 g) durante 10 minutos. Una vez obtenido el plasma se congeló a -20°C hasta que se envió a un laboratorio externo para la determinación de las concentraciones plasmáticas de aripiprazol.

#### 3.2 Determinación analítica de aripiprazol

La concentración de aripiprazol se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución en tándem con espectrofotometría de masas (HPLC-MS/MS, del inglés “*High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*”) en un laboratorio externo acreditado. El límite inferior de cuantificación fue fijado en 0,5 ng/mL. La preparación de muestras fue llevada a cabo mediante una extracción en fase sólida usando cartuchos de intercambio catiónico de 10 mg. El analito se extrajo de 200 µL de plasma humano. Para ello a todas las muestras (muestras del estudio, los calibradores o control de calidad) se añadió 800 µL de la solución de trabajo con el estándar interno. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo por cromatografía en fase reversa en la columna Zorbax SB-C18 (4.6 x 50 mm, 3.5µm) suministrada por Agilent Technologies (Santa Clara, California, EEUU). La separación del analito se realizó a temperatura ambiente por el método isocrático y un flujo de 1,0 mL/min. El tampón acuoso utilizado consistió en formato de amonio 1 mM y ácido fórmico 0,1% en agua Milli-Q (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU). Para la fase móvil se aplicaron dos eluyentes: tampón acuoso (eluyente A) y metanol (eluyente B), en proporción 42:58 (v/v).

#### 3.3 Determinación analítica de dehidro-aripiprazol

En la Unidad de Analítica y de Farmacocinética del Servicio de Farmacología Clínica se desarrolló y validó un método de HPLC-MS/MS para la determinación conjunta de aripiprazol y de su metabolito activo, el dehidro-aripiprazol en plasma humano (Wojnicz et al. 2018). Para el presente trabajo sólo se emplearon los datos de las

concentraciones de dehidro-aripiprazol obtenidas con este método mientras que los datos que se presentan de las concentraciones de aripiprazol corresponden a los obtenidos mediante el método descrito en el punto 3.2.

Los tiempos a los que se determinaron las concentraciones de dehidro-aripiprazol fueron los siguientes: 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h. Por limitaciones económicas estas determinaciones solo se pudieron llevar a cabo en 103 sujetos. Las muestras sólo se midieron para la formulación de referencia (Abilify®), excepto en 8 sujetos en los que no había muestra disponible de la formulación referencia por lo que se midieron las muestras de la formulación test.

El equipo de HPLC usado fue un módulo de la serie 1200 de Agilent Technologies (Santa Clara, California, Estados Unidos) controlado a través del programa “Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition” para la programación de las condiciones cromatográficas y las muestras. El analito, dehidro-aripiprazol, se extrajo de un volumen de 200 µL de plasma humano mediante extracción en fase sólida usando los cartuchos Oasis PRiME HLB 96-well µElution Plate, de 3 mg (Waters, Madrid, España). Un estándar interno deuterado, el aripiprazol-d8, fue empleado como control interno para el proceso de extracción. El analito y su estándar interno fueron extraídos y recogidos en una placa de recolección para ser inyectados directamente (volumen de inyección: 5 µL) en el equipo HPLC-MS/MS. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo por cromatografía en fase reversa mediante la columna analítica ACE C18-PFP (Advanced Chromatography Technologies, suministrado por Symta, Madrid, España) con las siguientes dimensiones: diametro 4,6 mm x 100 mm de largo y 3 µm de tamaño de partícula. La columna fue protegida mediante un filtro online de 0.2-µm. La temperatura de la columna se fijó en 25°C. El tampón acuoso utilizado fue la combinación del ácido fórmico 0,2% y amoníaco 0,3% en agua MilliQ (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU) fijado a un pH=4,0. La separación cromatográfica se realizó por un método de gradiente con un flujo de 0,6 mL/min, fue por método de gradiente, a partir de dos eluyentes: tampón acuoso (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B). El tiempo de separación cromatográfica se estableció en 5 min con un periodo de re-equilibración de 3 min, dando un tiempo total de cromatograma de 8 minutos por muestra. El detector usado en la espectrometría de masas fue un Triple

Quadrupolo de la serie 6410 de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EEUU) equipado con una fuente de ionización “electrospray” (ESI, del inglés “*ElectroSpray Ionization*”). El analito fue detectado por ionización positiva y por el método de trabajo de “*Multiple Reaction Monitoring*”. El rango de concentraciones fue establecido en función de las concentraciones observadas en experimentos preliminares.

Este método fue validado de acuerdo a las recomendaciones de las guías de validación de métodos analíticos de la FDA y la EMA. Para medir la precisión y exactitud, en un día solo y en tres días consecutivos, se realizaron medidas a 4 niveles de concentración (de concentración más baja, baja, mediana y alta) de dehidro-aripiprazol en 6 lotes (24 muestras por día) por triplicado. En total, para los test de precisión y exactitud, se procesaron y analizaron 96 muestras por triplicado, en los cuatro días de validación. La precisión se midió como el coeficiente de variación (CV, en %) y la exactitud como el sesgo de exactitud, es decir, la diferencia entre el valor teórico y el medido. Para ser aceptado los resultados de precisión y exactitud tienen que tener un error menor al 15% para todas las muestras, excepto para el límite más bajo de cuantificación (LLOQ, del inglés “*Lower limit of quantification*”) en el que se acepta hasta el 20%. El método fue reproducible y preciso ya que los valores de CV fueron menores del 11% y del sesgo de exactitud menor de 10%. En cuanto a la sensibilidad del método, el LLOQ se estableció en 0,35 ng/mL. Para que el LLOQ sea aceptado, el área del analito debe ser al menos 5 veces superior al área del plasma blanco, es decir, el ratio área analito/área blanco > 5. Para el LLOQ de dehidro-aripiprazol, el ratio obtenido fue 12,82, cumpliendo con el mínimo requerido. En el caso del estándar interno (EI) usado para calcular LLOQ del dehidro-aripiprazol, los criterios de aceptación fueron los siguientes: el área del EI en el LLOQ debe ser al menos 20 veces superior al área del plasma blanco, es decir, el ratio área EI/área blanco > 20. El ratio para el EI fue 725.04, muy por encima de lo requerido, demostrando selectividad del método analítico.

En cuanto a su selectividad (especificidad), el método fue selectivo ya que no hubo interferencias significativas en la detección del analito en la ausencia ( $1.70 \pm 9.41$ ) o presencia de su patrón interno ( $2.13 \pm 1.97$ ) en 6 muestras de plasma blanco diferentes.

#### 4. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

El cálculo de los parámetros farmacocinéticos se llevó a cabo mediante el programa WinNonlin Professional Edition version 2.0 (Pharsight Corporation, Palo Alto, California, EEUU) mediante un modelo no compartimental.

Los parámetros farmacocinéticos estudiados fueron los siguientes:

- Área bajo la curva concentración-tiempo (AUC) desde el tiempo de administración hasta infinito ( $AUC_{0-\infty}$ ) y AUC desde el tiempo de administración hasta el último punto de muestreo ( $AUC_{0-t}$ ): este parámetro refleja la cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica.
- Concentración máxima ( $C_{max}$ ): representa la concentración plasmática máxima alcanzada después de la administración del fármaco.
- Tiempo para alcanzar la concentración máxima ( $T_{max}$ ).
- Semivida de eliminación ( $T_{1/2}$ ): es el tiempo que tarda la concentración de un fármaco en reducirse a la mitad.
- Aclaramiento ajustado a la biodisponibilidad ( $Cl/F$ ): es el volumen de plasma que es depurado de fármaco por unidad de tiempo. Como el fármaco no se administró por vía intravenosa está ajustado a la biodisponibilidad.
- Volumen de distribución ajustado a la biodisponibilidad ( $V_d/F$ ): es el volumen que ocuparía el fármaco en el organismo si en todos los órganos o compartimentos existiera la misma concentración que en sangre. Como no se administró por vía intravenosa está ajustado a la biodisponibilidad.

Los valores de la  $C_{max}$  y  $T_{max}$  se obtuvieron directamente de las concentraciones plasmáticas del fármaco en los distintos tiempos de muestreo. El  $AUC_{0-t}$  se calculó mediante un método trapezoidal. La  $T_{1/2}$  se calculó dividiendo 0.693 entre la constante de eliminación ( $k_e$ ), que es la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal a partir de los puntos correspondientes a la fase de eliminación del fármaco. Para determinar el número de puntos utilizados en el cálculo de  $k$ , WinNonlin comienza la regresión a partir de los últimos tres puntos detectables, calculando  $R^2$  ajustado al número de puntos añadiendo en cada paso un cuarto, quinto... punto. Se estima entonces la pendiente de la recta de eliminación con los puntos que proporcionen el  $R^2$

ajustado más alto, mediante una regresión lineal del logaritmo natural de las concentraciones.

El AUC total ( $AUC_{0-\infty}$ ) se calculó mediante la suma de dos AUC parciales: a)  $AUC_{0-t}$ , entre el tiempo anterior al primero con concentraciones detectables y el último con concentraciones detectables, calculada mediante la regla trapezoidal; y b)  $AUC_{t-\infty}$ , calculada como el cociente  $C/k$ , siendo  $C$  la última concentración detectable y  $k$  la pendiente de la recta obtenida mediante regresión lineal a partir de los puntos correspondientes a la fase de eliminación del fármaco. El  $Cl$  se calculó dividiendo la dosis entre el AUC total. El  $V_d$  se obtuvo dividiendo el aclaramiento entre la  $k_e$ .

En el caso del metabolito activo sólo se calcularon los valores de  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$  debido a los escasos puntos de muestreo en la fase de eliminación, que no permitieron calcular la constante de eliminación ( $k$ ).

Para establecer la bioequivalencia del aripiprazol entre las formulaciones referencia y test en los 6 ensayos clínicos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) del  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$ , las dos variables principales establecidas por la EMA y FDA para demostrar que dos formulaciones son bioequivalentes entre sí. Este ANOVA tiene en cuenta 4 factores: secuencia, sujeto (secuencia), periodo y formulación. De acuerdo a los criterios establecidos por la EMA y FDA dos formulaciones son consideradas bioequivalentes si el límite inferior y el límite superior del intervalo de confianza del 90%, obtenido en el ANOVA del  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$  transformados logarítmicamente, se encuentran dentro del rango 80-125%.

Con el fin de evaluar si existían diferencias en la biodisponibilidad entre los comprimidos convencionales y los bucodispersables, se realizó un análisis de bioequivalencia entre la formulación Abilify® (comprimidos convencionales) y Abilify® ODT (comprimidos bucodispersables). Para ello se realizó una simulación de un estudio paralelo en el que se compararon todos los sujetos que recibieron Abilify® con los sujetos que recibieron Abilify® ODT. Se excluyeron aquellos sujetos que participaron en varios estudios y recibieron dos veces la formulación Abilify® o dos veces la formulación Abilify® ODT. El análisis de la bioequivalencia se realizó mediante un ANOVA con transformación logarítmica del  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$ . Este ANOVA por el tipo de

diseño paralelo solo podía tener en cuenta el factor fármaco. Para establecer la bioequivalencia se siguieron los criterios descritos anteriormente.

## 5. ANÁLISIS FARMACODINÁMICO

### 5.1 Análisis de la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos

Durante ambos periodos de ingreso a cada voluntario se le midió la tensión arterial en posición supina usando un monitor automático (Monitor Carescape V100 de General Electric) a los siguientes tiempos: antes de la administración del fármaco, 0.5, 2, 4, 6 y 8 horas después de la misma.

Además, se realizaron tres electrocardiogramas de 12 derivaciones con un equipo de la Marca Esaote modelo P8000 (antes de la administración del fármaco, 4 y 8 horas después). Dentro de los parámetros electrocardiográficos nos centramos principalmente en el QTc y en la frecuencia cardíaca. Como el intervalo QT tiene una relación inversa con la frecuencia cardíaca debe ser corregido en base a la misma. Para ello empleamos la fórmula de Bazett's (Bazett, 1920). De acuerdo a la guía ICH "The Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs" (ICH 2005) se consideró como prolongación del intervalo QTc relevante un valor absoluto mayor a 450 ms o un cambio con respecto al basal mayor a 30 ms (independientemente del sexo).

### 5.2 Determinación de prolactina en plasma

La determinación de las concentraciones de prolactina en plasma se realizó mediante ELISA (del inglés, "*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*") con un kit comercial, ab108655 – Prolactin Human ELISA Kit de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Se trata de un ELISA tipo "sándwich", su fundamento es el siguiente: en primer lugar, se recubre el pocillo con anticuerpos anti-Prolactina y se realiza un primer lavado para eliminar el exceso de anticuerpo. Se añaden las muestras y estándares a los pocillos, uniéndose la prolactina al primer anticuerpo. Se realiza otro lavado para eliminar el material no retenido y se aplica entonces un segundo anticuerpo, anti-prolactina-HRP conjugado (HRP, del inglés "*Horseradish-peroxidase*"), que se va a unir al complejo anticuerpo-prolactina. Así pues, cada molécula de antígeno (prolactina) va a estar unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y a otro segundo anticuerpo que lo marca.

Después de la incubación, se lava el exceso de material y se añade tetrametilbencidina que será catalizado por HRP para producir coloración azul. Por último se añade la solución de “stop” que produce un cambio de coloración a amarillo. La intensidad de la señal va a ser proporcional a la cantidad de prolactina en la muestra y será medida a 450 nm (figura 10).



**Figura 10.** Método de cuantificación de la concentración de prolactina. Adaptada de manual de ab108655 – Prolactin Human ELISA Kit de Abcam®.

El límite de cuantificación de prolactina fue de 2 ng/mL. La determinación de los niveles de prolactina se llevó a cabo en 31 sujetos tratados con aripiprazol y en 12 sujetos tratados con ibuprofeno como grupo control del ritmo circadiano de esta hormona. Dichos niveles fueron medidos antes de recibir la dosis de aripiprazol y a los siguientes tiempos post-dosis: 0.5, 1, 1.5, 3, 6 y 12 horas. La selección del muestreo se llevó a cabo en base a la  $T_{max}$  y la  $T_{1/2}$  del aripiprazol. Se definió hiperprolactinemia como niveles de prolactina mayores a 24 ng/mL en mujeres y a 20 ng/mL en hombres (Shim et al. 2007). Para el análisis estadístico se calcularon los siguientes parámetros cinéticos a partir de las concentraciones de prolactina:  $AUC_{0-12h}$ , concentración basal,  $C_{max}$  y  $C_{12h}$ . Este cálculo se llevó a cabo con el programa WinNonlin Professional Version 2.0. (Pharsight Corporation, Palo Alto, California, EEUU) tal y como se ha reflejado en el apartado “Análisis farmacocinetico”. Con el objetivo de distinguir si el aripiprazol tenía un efecto sobre los niveles de prolactina usamos una población control de 12 voluntarios sanos que recibieron una dosis única de 600 mg de ibuprofeno, un fármaco que no ejerce efecto sobre las concentraciones de prolactina.



## 6. GENOTIPADO

### 6.1 Extracción de ADN

Se aisló el ADN genómico a partir de una muestra de sangre mediante el extractor automático de ácidos nucleicos MagNA Pure LC 2.0® (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA). Una vez obtenido el ADN medimos su concentración mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000® (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). Además de medir su concentración a 260 nm, este equipo también nos permite determinar la pureza del ADN usando la relación de absorbancia a 260 y 280 nm ( $A_{260/280}$ ) considerándose puro aquel ADN con un ratio entre 1,8 y 2,0. Es importante que la muestra sea pura ya que la presencia de contaminantes puede ejercer un efecto inhibitorio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés “*Polymerase chain reaction*”) (Desjardins et al. 2010).

### 6.2 Selección de polimorfismos genéticos

Para la selección de los polimorfismos a analizar nos basamos en el mecanismo de acción y la farmacocinética de aripiprazol. Por este motivo hemos seleccionado polimorfismos que se encuentran en los genes que codifican para las dianas farmacológicas de aripiprazol, es decir, los receptores dopaminérgicos (*DRD2* y *DRD3*) y serotoninérgicos (*HTR2A* y *HTR2C*) (tabla 8) y aquellos que se encuentran en los genes que codifican las principales enzimas metabolizadoras (*CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*) y una proteína transportadora (*ABCB1*) (tabla 9).

**Tabla 8.** Relación de genes y polimorfismos analizados relacionados con la farmacodinamia de aripiprazol.

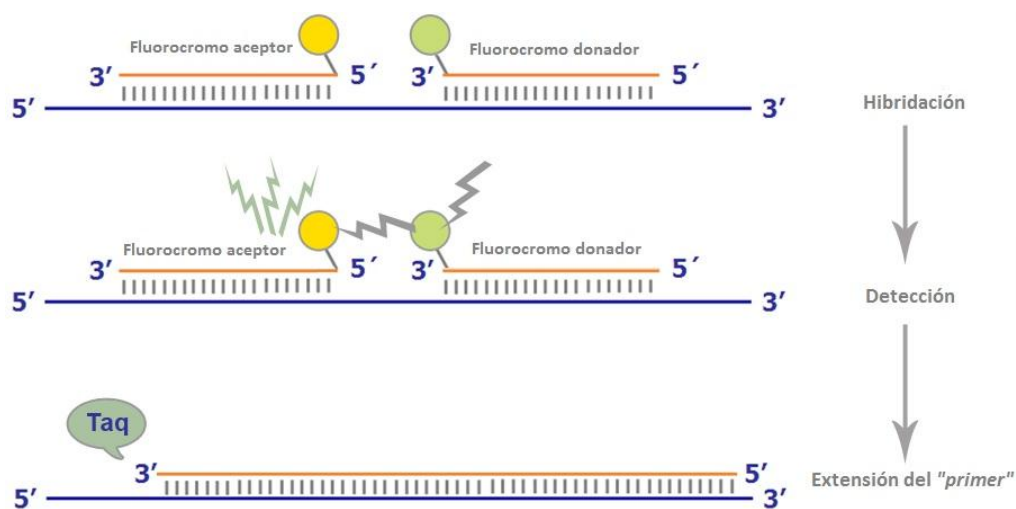
| Farmacodinamia (receptores) |                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| Gen                         | Polimorfismo                        |
| <i>DRD2</i>                 | Taq1A (rs1800497) y C957T (rs6277)  |
| <i>DRD3</i>                 | Ser9Gly (rs6280)                    |
| <i>HTR2A</i>                | T102C (rs6313) y His452Tyr (rs6314) |
| <i>HTR2C</i>                | -759C/T (rs3813929)                 |

**Tabla 9.** Relación de genes y polimorfismos analizados relacionados con la farmacocinética de aripiprazol.

| Farmacocinética (enzimas y proteína transportadora) |   |
|---|---|
| Gen   | Polimorfismo  |
| <i>CYP2D6</i>                                       | *3 (rs35742686), *4 (rs3892097), *5 (no tiene rs), *6 (rs5030655), *7 (rs5030867), *9 (rs5030656) y CNVs. |
| <i>CYP3A4</i>                                       | *20 (rs67666821), *22 (rs35599367).   |
| <i>CYP3A5</i>                                       | *3 (rs776746).  |
| <i>ABCB1</i>  | C1236T (rs1128503), C3435T (rs1045642) y G2677T/A (rs2032582).  |

### 6.3 Genotipado mediante sondas “FRET”

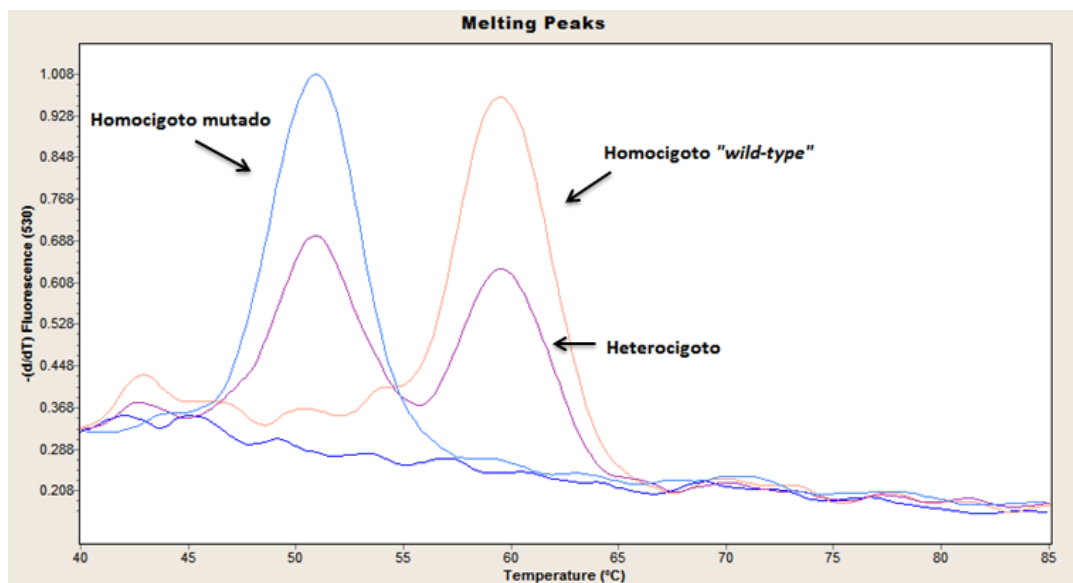
Para el genotipado de dichos polimorfismos se empleó un equipo de PCR a tiempo real denominado Lightcycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Este equipo permite analizar 3 polimorfismos en una misma PCR ya que dispone de 3 canales de lectura. Para dicho propósito emplea sondas de hibridación fluorescente y se basa en el principio de transferencia de energía entre fluorocromos (“FRET”, del inglés “*Förster resonance energy transfer*”) (figura 11). Se utilizan dos sondas que están marcadas con moléculas fluorescentes (una en posición 5’ y la otra en 3’) y que van a hibridar en regiones adyacentes del ADN. Cuando tiene lugar la hibridación el fluorocromo donador se excita y transfiere su energía al fluorocromo aceptor que emitirá fluorescencia que será detectada por el aparato. Esta fluorescencia será proporcional a la cantidad de producto amplificado.



**Figura 11.** Fenómeno de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET).

Además de la cuantificación de las muestras, este sistema permite el genotipado mediante el análisis de las curvas de fusión. La temperatura de fusión es aquella a la cual las hebras de la doble hélice de ADN se separan, dicha temperatura va a estar condicionada por el contenido y la longitud de la secuencia de ADN. La sonda puede ser complementaria al alelo “*wild-type*” o al mutado, siendo la temperatura de fusión mayor cuanto mayor sea la compatibilidad entre el ADN y la sonda.

Gracias a las diferencias en la temperatura de fusión podremos conocer el genotipo de la muestra (figura 12).



**Figura 12.** Ejemplo de genotipado mediante análisis de curvas de fusión.

Para llevar a cabo la PCR se emplearon dos kits comerciales: “LightMix® Kit for the detection of CYP2D6 alleles \*3, \*4 and \*5/\*5” (TIB Molbiol, Berlin, Alemania) y “LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe” (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), según las instrucciones del fabricante.

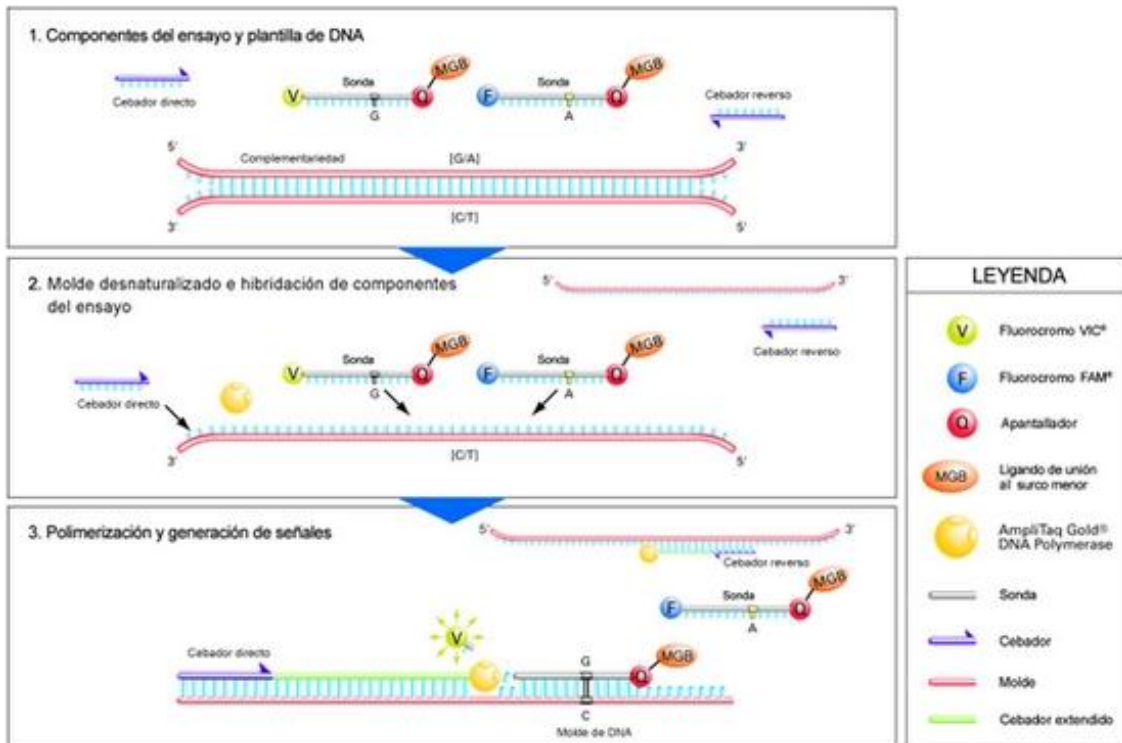
El protocolo de esta PCR se desarrolló por fases de la siguiente manera:

- Fase de **desnaturalización** de 10 minutos a 95°C.
- Fase de **amplificación** del ADN, que constó de 45 ciclos con las siguientes temperaturas y duración: 95°C (5 segundos), 60°C (10 segundos) y 72°C (15 segundos).
- Fase de **“melting”** (análisis de las curvas de fusión para la identificación del producto de PCR): 95°C (20 segundos), 40°C (20 segundos) y 85°C.
- Fase de **enfriamiento** de 30 segundos a 40°C.

El volumen de la mezcla de PCR fue de 15 µL por pocillo, a esta mezcla le añadimos 5 µL de ADN de cada muestra problema haciendo un volumen final total de 20 µL por pocillo. La mezcla de PCR estuvo compuesta por 9,4 µL de agua, 1,6 µL de solución de  $Mg^{2+}$  25mM, 2 µL de “*reagent mix*” (compuesta por los “*primers*” y sondas) y 2 µL de “Roche Master” (contiene Taq ADN polimerasa). Todas las reacciones se llevaron a cabo con al menos dos controles positivos (proporcionado por el fabricante) así como un control negativo.

#### 6.4 Genotipado mediante sondas Taqman

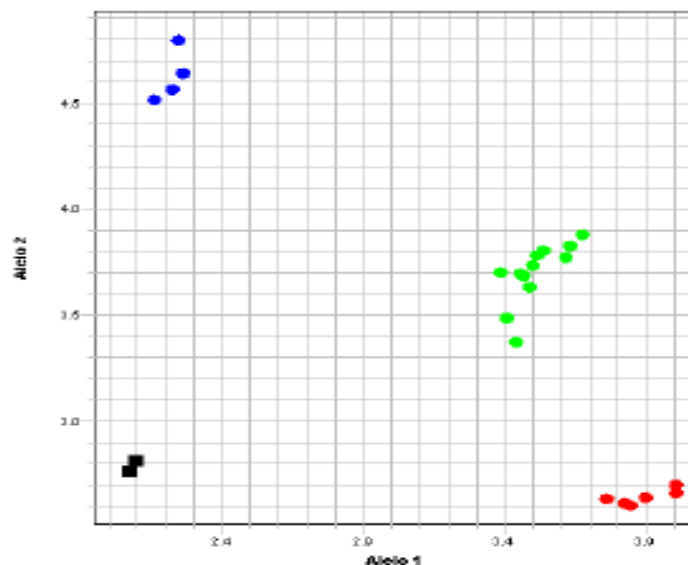
El genotipado del resto de polimorfismos (excepto *CYP3A4*\*20 y confirmación de duplicación en alelos \*1 y \*4 en sujetos heterocigotos) se llevó a cabo gracias al sistema StepOne™ que utiliza un método de PCR a tiempo real. Este equipo sólo permite analizar un polimorfismo por experimento. Emplea dos sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) para discriminar entre los dos alelos posibles (“*wild-type*” o mutado), siendo cada una de las sondas complementaria a uno de los alelos. Cada sonda presenta en su extremo 5’ un fluorocromo notificador y en su extremo 3’ presenta un apantallador de fluorescencia (“*quencher*”), esta sonda marcada va a hibridar específicamente en el amplicón pero debido a la proximidad entre el notificador y el “*quencher*” no se va a producir emisión de fluorescencia. Durante la fase de extensión la ADN polimerasa debido a su actividad exonucleasa 5’-3’ va a provocar la separación del “*quencher*” del fluorocromo dando lugar a la emisión de fluorescencia, como se muestra en la figura 13.



**Figura 13.** Fases de una PCR con la tecnología Taqman®.

Mediante la cuantificación de la fluorescencia obtendremos una gráfica de discriminación alélica en la que se agrupan las muestras según el genotipo (figura 14):

- Homocigoto para el alelo 1, sólo fluorescencia de la sonda marcada con el fluorocromo VIC® (en la gráfica en rojo).
- Homocigoto para el alelo 2, sólo fluorescencia de la sonda marcada con el fluorocromo FAM™ (en la gráfica en azul).
- Heterocigoto (en la gráfica en verde), fluorescencia de ambas sondas marcadas respectivamente con los fluorocromos VIC® y FAM™.



**Figura 14.** Ejemplo de los resultados de un experimento de genotipado mediante sondas Taqman.

El volumen de la mezcla de PCR constó de los siguientes reactivos por pocillo: 12,50  $\mu$ L de 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase®UNG, 1,25  $\mu$ L de 20X TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay o 20X TaqMan® SNP Genotyping Assay (dependiendo del polimorfismo a analizar) y 11,25  $\mu$ L de ADN genómico diluido en agua. La enzima empleada fue la AmpliTaq Gold®DNA Polymerase. Las sondas empleadas fueron diseñadas y validadas por Applied Biosystems (Foster City, California, EEUU), como se muestra en la tabla 10. En todos los experimentos se incluyó al menos un control negativo y dos positivos.

**Tabla 10.** Información de las Sondas Taqman® empleadas para el estudio de cada polimorfismo.

| TaqMan® SNP Genotyping Assay |              |               | TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay |              |                               |
|------------------------------|--------------|---------------|--|--------------|-------------------------------|
| Gen                          | Polimorfismo | ID ensayo     | Gen                                      | Polimorfismo | ID ensayo                     |
| <i>DRD2</i>                  | Taq1A        | C_7486676_10  | <i>CYP2D6</i>                            | *6           | C_32407243_20                 |
| <i>DRD2</i>                  | C957T        | C_11339240_10 | <i>CYP2D6</i>                            | *7           | C_32388575_30                 |
| <i>DRD3</i>                  | Ser9Gly      | C_949770_10   | <i>CYP2D6</i>                            | *9           | C_32407229_60                 |
| <i>HTR2A</i>                 | T102C        | C_3042197_1_  | <i>CYP3A5</i>                            | *3           | C_26201809_30                 |
| <i>HTR2C</i>                 | -759C/T      | C_27488117_10 | <i>ABCB1</i>                             | C1236T       | C_7586662_10                  |
| <i>HTR2A</i>                 | His452Tyr    | C_11696920_20 | <i>ABCB1</i>                             | C3435T       | C_7586657_20                  |
| <i>CYP3A4</i>                | *22          | C_59013445_10 | <i>ABCB1</i>                             | G2677 T/A    | C_11711720C_30/C_11711720D_40 |

Las condiciones de la PCR (tabla 11) variaron según el tipo de ensayo realizado, para los TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays la PCR constó de 10 ciclos extra así como de una fase de extensión de mayor duración. Esta modificación de las condiciones fueron llevadas a cabo con el fin de obtener unos datos de genotipado más fiables ya que estos polimorfismos presentan una mayor longitud del amplicón (160 pares de bases frente a los 100 pares de bases de los TaqMan® SNP Genotyping Assays).

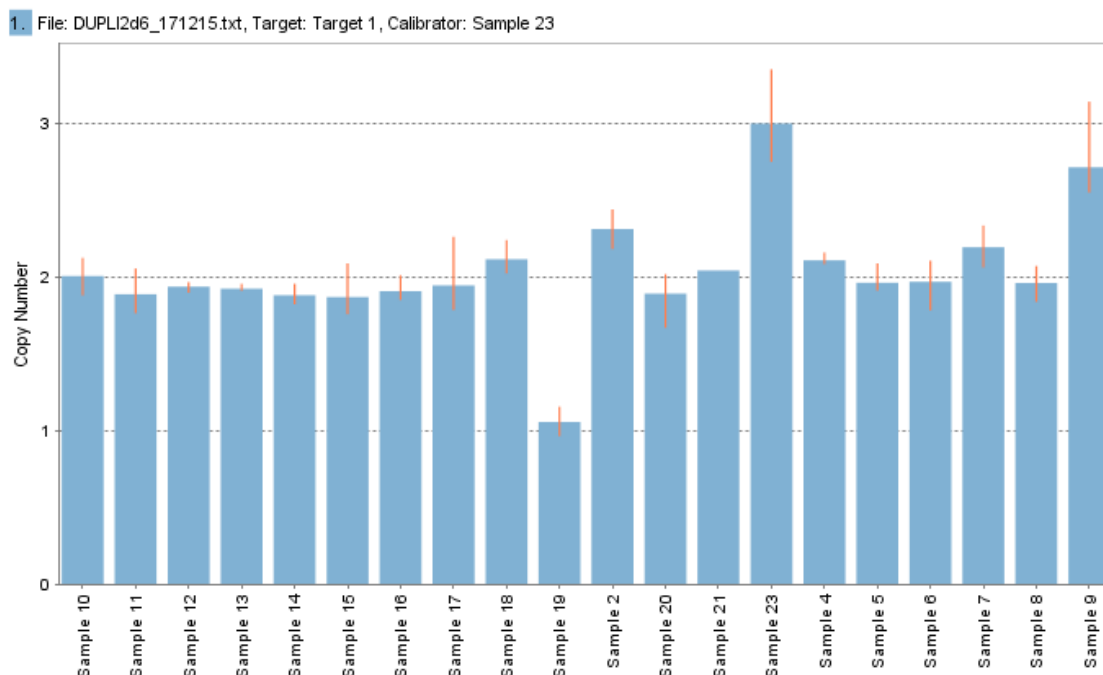
**Tabla 11.** Condiciones de la PCR en el instrumento StepOnePlus™ según el ensayo empleado.

| TaqMan® SNP Genotyping Assay             |                    |             |             |
|--|--------------------|-------------|-------------|
| Fase                                     |                    | Duración    | Temperatura |
| Activación enzima                        |                    | 10 minutos  | 95°C        |
| Desnaturalización                        | PCR<br>(40 ciclos) | 15 segundos | 92°C        |
| “Annealing”/Extensión                    |                    | 60 segundos | 60°C        |
| TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay |                    |             |             |
| Fase                                     |                    | Duración    | Temperatura |
| Activación enzima                        |                    | 10 minutos  | 95°C        |
| Desnaturalización                        | PCR<br>(50 ciclos) | 15 segundos | 92°C        |
| “Annealing”/Extensión                    |                    | 90 segundos | 60°C        |

### 6.5 Determinación del número de copias del gen *CYP2D6*

La determinación del número de copias del gen *CYP2D6* se llevó a cabo mediante PCR dúplex a tiempo real con el instrumento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). Para este propósito se empleó un kit comercial, TaqMan Copy Number Assay (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Este ensayo (Assay ID: Hs00010001\_cn) detecta la secuencia específica del exón 9 del *CYP2D6* pero no va a amplificar los pseudogenes *CYP2D7* y *CYP2D8* o alelos híbridos *CYP2D6/CYP2D7* con el exón 9 de *CYP2D7* (como el *CYP2D6\*36*). Para reducir la variabilidad del método las muestras se corrieron en cuádruplicado. Empleamos un control positivo que fue adquirido al Instituto Coriell (Camden, New Jersey, USA) con un número de copias conocido del gen *CYP2D6* (3 copias, Coriell ID: NA17221). El ensayo se llevó a cabo con un control interno, RNaseP TaqMan Copy Number Reference Assay (Assay ID: 4403326; Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Una vez realizado el experimento para calcular el número de copias exacto se empleó el software

CopyCaller (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (figura 15), que emplea el método comparativo  $\Delta\Delta CT$  con este propósito (Schmittgen et al. 2008).



**Figura 15.** Ejemplo de diagrama donde se representa el número de copias obtenido para el gen *CYP2D6* con el software CopyCaller. En el eje X cada barra representa una muestra de un voluntario mientras que el eje Y representa el número de copias. La muestra 23 corresponde al control conocido (3 copias del gen). La muestra 9 presenta una duplicación y la muestra 19 una delección.

Las condiciones empleadas en la PCR fueron las siguientes: la reacción de amplificación consistió en una única etapa en la que se sometió a 95°C durante 10 minutos (para activación de la enzima), seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y por último, 60°C durante 1 minuto.

Se trata de una PCR dúplex en tiempo real, ya que se coamplifica el gen *CYP2D6* con el control interno (gen RNasaP). El “Copy Number Assay” se encarga de detectar el gen de interés mientras que el “Reference Assay” (gen de la RNasa P H1 RNA) se emplea como control interno. Esta PCR dúplex funciona como una PCR a tiempo real por sondas Taqman, solo que hay dos secuencias.

Para saber el número exacto de copias de nuestra muestra se emplea un método de cuantificación relativa (método comparativo CT). Se denomina así ya que se determina



el número relativo de copias del gen *CYP2D6*, normalizado con respecto al número de copias conocido de la secuencia referencia (RNAsaP). Este método mide la diferencia de CT ( $\Delta$ CT) entre el target y la secuencia referencia. Después compara los valores de  $\Delta$ CT de las muestras test con respecto a la muestra calibradora.

En el caso de aquellos sujetos que tenían 3 copias o más de este gen en heterocigosis, las variaciones en el número de copias específicas de alelo (\*1xN y \*4xN) fueron identificadas en el Departamento de Genética del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz mediante PCR Digital Droplet siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Pleasanton, California).

#### 6.6 Determinación del alelo *CYP3A4\*20*

El polimorfismo *CYP3A4\*20* fue genotipado empleando el kit KASPar SNP Genotyping System (LGC Genomics, Herts, Reino Unido). Para la detección de fluorescencia y la asignación de alelos se empleó el instrumento “Sequence Detection System ABI PRISM 7900HT” (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). En caso de ser portadores de dicho alelo, la confirmación se realizó mediante secuenciación Sanger empleando el “ABI PRISM 3700 DNA Analyzer capillary sequencer” (Applied Biosystems, Foster City, California). Estos experimentos fueron llevados a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

### 7. RECOGIDA Y CLASIFICACIÓN DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Para la recogida de los acontecimientos adversos (AA) durante todo el desarrollo del ensayo clínico se preguntó a los voluntarios si habían sufrido algún AA desde la administración del fármaco y también se recogieron aquellos AA que fueron notificados espontáneamente por los voluntarios. De cada AA se recogió: secuencia temporal, causalidad, intensidad y resolución (con o sin tratamiento farmacológico). Para determinar la causalidad de cada AA se emplearon los criterios de Karch y Lasagna (Karch et al. 1977):

- **Definido:** si el AA tiene una relación temporal firme con la administración del fármaco en estudio, es un efecto conocido con ese fármaco, no existe otra causa alternativa que la produzca, mejora al retirar el medicamento y reaparece si lo reintroducimos.

- **Probable:** si el AA tiene una relación temporal firme con la administración del fármaco en estudio, es un efecto conocido con ese fármaco y es poco probable o significativamente menos probable que sea producido por otra causa.
- **Posible:** si el AA tiene una relación temporal firme con la administración del fármaco en estudio, y la relación con una etiología alternativa es igual o menos probable que la posible relación con el producto en estudio.
- **Improbable:** si el AA tiene poca o ninguna relación temporal con la administración del fármaco en estudio, y/o existe una etiología alternativa más probable.
- **No relacionado:** si el AA se debe a una enfermedad subyacente o concurrente o es el efecto de otro fármaco, y no existe relación temporal congruente con la administración del fármaco en estudio.

Tras determinar la causalidad de cada uno de ellos, sólo se consideraron como RAM aquellos AA definidos, probables y posibles. Dichos AA son los que se han considerado para el análisis estadístico posterior.

Además, las RA se agruparon según la clasificación SOC (del inglés, “*System Organ Class*”), de acuerdo a las indicaciones de la ficha técnica del fármaco (Ficha técnica Abilify®, EMA):

- Generales: astenia, caída capilar y dolor lumbar.
- Cardiovasculares: hipotensión, prolongación intervalo QTc, taquicardia y síncope.
- Gastrointestinales: diarrea, elevación de enzimas hepáticas, gastroenteritis, náuseas/vómitos y dolor abdominal.
- Genitourinarias: poliuria.
- Neurológicas: mareo, cefalea, hipo y somnolencia.
- Psiquiátricas: pesadillas, insomnio y nerviosismo.
- Respiratorias: dificultad respiratoria.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicaco, Illinois, EEUU), considerándose estadísticamente significativos aquellos valores con  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se llevó a cabo conjuntamente con los datos de ambas formulaciones (test y referencia tanto de comprimidos convencionales como de comprimidos bucodispersables) debido a que todas ellas fueron bioequivalentes. Es importante destacar que hubo algunos sujetos que participaron en más de un ensayo. En estos casos, para el análisis farmacocinético se realizó la media de los parámetros del total de ensayos en los que había participado. En el análisis estadístico de las RAM sólo se tuvo en cuenta si se había producido una determinada RAM o no, sin contabilizar el número de veces que se desarrolló. Tras el análisis univariante se realizó un análisis multivariante, como se explica más adelante.

### 8.1 Análisis estadístico de los polimorfismos genéticos

En primer lugar, se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes polimorfismos. Una vez calculadas se comprobó que se cumpliese el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el software de Finneti (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). El equilibrio de Hardy-Weinberg es un postulado que se aplica a genética de poblaciones y que establece que en una población suficientemente grande donde los apareamientos se producen al azar y que no está sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas se van a mantener constantes de una generación a otra, una vez alcanzado el estado de equilibrio (Hardy 1908; Weinberg 1908). El no cumplimiento de este equilibrio puede indicar sesgos tales como errores en el genotipado o relaciones de parentesco entre los sujetos (Iniesta et al. 2005). Se considera que un polimorfismo cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg si el valor de  $p > 0,05$ .

En el caso del gen multialélico *CYP2D6* se clasificó a los sujetos en los cuatro fenotipos metabolizadores según la actividad enzimática del *CYP2D6* de acuerdo al criterio de Gaedigk y colaboradores previamente explicado en la Introducción (ver tablas 3 y 4) (Gaedigk et al. 2008). Para el polimorfismo *CYP3A5*\*3 se clasificó a los sujetos en dos grupos: aquellos que expresan la enzima (genotipo \*1/\*1 y \*1/\*3) y los que no

(\*3/\*3). Para el análisis estadístico del polimorfismo Taq1A en el gen *DRD2* se clasificó a los sujetos en portadores del alelo A1 y no portadores, ya que la representatividad del genotipo A1/A1 era muy baja. En el caso del polimorfismo -759C/T en el gen *HTR2C* se dividió a los sujetos en portadores del alelo T y no portadores. Los genotipos del polimorfismo multialélico G2677T/A en el gen *ABCB1* se dividieron en tres grupos dependiendo de la actividad del alelo: “A/A+A/T”, “C/A+C/T” y “C/C”. Como sólo encontramos un portador del alelo \*20 del *CYP3A4*, lo reagrupamos con los portadores del alelo \*22. Además comparamos la relación entre los diferentes genotipos y el sexo mediante la prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

#### 8.2 Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos analizados en los ensayos clínicos fueron los siguientes: AUC (ng\*h/mL),  $C_{max}$  (ng/mL), ambos ajustados por dosis de aripiprazol/peso sujeto (mg/kg). También se calcularon otros parámetros tales como  $T_{max}$  (h), la semivida de eliminación [ $t_{1/2}$  (h)], el volumen de distribución [ $V_d$  (L/kg)] y aclaramiento plasmático [Cl (L/h/kg)], estos dos últimos ajustados por el peso del sujeto (kg). Para el análisis estadístico se realizó una transformación logarítmica de dichos parámetros, excepto en el caso de  $T_{max}$ , del que se analizó el valor crudo, de acuerdo a las recomendaciones de las EMA (EMA 2010).

Una vez determinados dichos parámetros, analizamos si otras variables como el sexo o el genotipo tenían influencia en la farmacocinética del aripiprazol. En el caso del sexo, se llevó a cabo la prueba T para muestras independientes. En el caso de los polimorfismos genéticos se realizó un ANOVA, excepto en aquellos que sólo tenían dos categorías en los que se realizó la prueba T para muestras independientes.

#### 8.3 Análisis estadístico de las reacciones adversas

Se evaluó el papel del sexo y del genotipo en el desarrollo de reacciones adversas. En ambos casos, al tratarse de variables cualitativas, se realizó mediante la prueba  $\chi^2$ . La influencia de la farmacocinética en el desarrollo de reacciones adversas fue determinada mediante la prueba T para muestras independientes, considerando los datos de cada periodo por separado y comparándose si los parámetros farmacocinéticos eran diferentes entre sujetos que sufrieron RAM y los que no.

Además, con el fin de evaluar la capacidad del AUC y  $C_{\max}$  para discriminar pacientes con reacciones adversas y náuseas/vómitos se realizaron curvas ROC (del inglés, “Receiver Operating Characteristics”) y se pudo determinar la sensibilidad y especificidad de las mismas.

#### 8.4 Análisis estadístico de los parámetros farmacodinámicos

La determinación de la influencia del sexo en los parámetros farmacodinámicos, como la tensión arterial sistólica (TAS), tensión arterial diastólica (TAD), QTc y FC, se realizó mediante la prueba T para muestras independientes. Además, mediante regresión lineal se estableció la correlación entre AUC,  $C_{\max}$  y la concentración de aripiprazol y dehidro-aripiprazol (a las 4 y 8 h post dosis) y la disminución de la TAS y TAD y el aumento del QTc y FC. La influencia del sexo y de los polimorfismos genéticos en los valores de AUC y  $C_{\max}$  de prolactina se evaluó mediante la prueba T o ANOVA para muestras independientes.

#### 8.5 Análisis multivariante

##### 8.5.1 Estudio de factores que afectan a los parámetros farmacocinéticos

Se emplearon modelos de regresión lineal múltiple para estudiar los factores que se relacionaban con variables dependientes farmacocinéticas, tanto de aripiprazol como de su metabolito y la suma y ratio de ambos.

En primer lugar se determinó la relación de los tres polimorfismos en el gen *ABCB1* y las posibles interacciones de segundo orden con cada dependiente. Las variables que se seleccionaron en esta etapa se emplearon en la siguiente. En la siguiente etapa, se analizó la relación de diversas variables independientes (sexo y los diferentes polimorfismos previamente mencionados) con las variables seleccionadas en la primera etapa. Por último, se comprobó la existencia de interacciones de segundo orden entre las variables seleccionadas en la anterior etapa.

Se emplearon los procedimientos de selección de variables “introducción forzada” y “pasos sucesivos” con criterios de entrada y salida de 0,05 y 0,1. Para la interpretación del modelo final se evaluaron los siguientes parámetros: coeficientes de regresión estandarizados ( $\beta$ ) y no estandarizados (B), bondad de ajuste ( $R^2$ ) y significación estadística. Además, se comprobaron los supuestos de linealidad (si aplicaba), no co-

linealidad, independencia, normalidad de los residuos y homocedasticidad. También se evaluó la existencia de casos atípicos e influyentes.

#### 8.5.2 Estudio de factores que afectan a las reacciones adversas

Para el estudio de los factores que se relacionan con el desarrollo de reacciones adversas específicas (cualquier RAM, dolor de cabeza, mareo y náuseas/vómitos) se emplearon modelos de regresión logística. Como en el caso anterior, en primer lugar se determinó la relación de los tres polimorfismos en el gen *ABCB1* y las posibles interacciones de segundo orden con cada dependiente. Las variables seleccionadas se emplearon para la siguiente etapa, en la que se incluyeron como variables independientes los parámetros farmacocinéticos AUC y  $C_{\max}$  de aripiprazol, de su metabolito y de la suma de ambos con el objetivo de seleccionar que molécula predecía mejor el desarrollo de RAM y se usaría por tanto en la siguiente etapa, para lo que se realizaron tres modelos diferentes. Una vez seleccionada la variable, se realizaron los modelos de regresión logística con el resto de variables independientes tales como sexo y genotipos y con aquellas seleccionadas en las dos primeras etapas. Por último, se comprobaron las interacciones de segundo orden con las variables seleccionadas en la etapa anterior.

Se emplearon los procedimientos de selección de variables “introducción forzada” y “selección hacia delante” con criterios de entrada y salida de 0,05 y 0,1. Para la interpretación del modelo final se evaluaron los siguientes parámetros: coeficientes no estandarizados (B), significación de los coeficientes, odds ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% del OR. También se evaluó la bondad de ajuste del modelo mediante la  $R^2$  de Cox y Snell y de Nagelkerke. Además, se comprobaron los supuestos de linealidad, no co-linealidad, independencia y dispersión proporcional a la media. También se evaluó la existencia de casos atípicos e influyentes.

Tanto en la regresión lineal como logística aquellas variables, como la mayoría de los polimorfismos genéticos, que presentaron tres categorías fueron transformadas en dos variables “dummy”. Cada conjunto de dos variables “dummy” contiene la misma información que la variable original, pero se crean para que se puedan incluir en el procedimiento de regresión de SPSS.

## IV. RESULTADOS

---





## 1. POBLACIÓN ESTUDIADA

### 1.1 Características demográficas

La población en estudio fueron 157 voluntarios sanos (89 hombres y 68 mujeres) que participaron en 6 ensayos clínicos de bioequivalencia realizados en la Unidad de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario de la Princesa entre Julio de 2012 y Mayo de 2014. Las características demográficas de los sujetos se encuentran recogidas en la tabla 12.

**Tabla 12.** Características demográficas de la población en estudio y diferencias según sexo. Se muestra media  $\pm$  desviación típica. \* $p < 0,001$  vs hombres.

|                | N (%)      | Edad (años)    | Peso (kg)       | Altura (m)       | IMC (kg/m <sup>2</sup> ) |
|----------------|------------|----------------|-----------------|------------------|--------------------------|
| <b>Total</b>   | 157 (100%) | 26,1 $\pm$ 7,5 | 70,0 $\pm$ 11,7 | 1,71 $\pm$ 0,09  | 23,9 $\pm$ 2,9           |
| <b>Hombres</b> | 89 (56,7%) | 25,5 $\pm$ 6,7 | 76,6 $\pm$ 9,3  | 1,76 $\pm$ 0,06  | 24,6 $\pm$ 2,6           |
| <b>Mujeres</b> | 68 (43,3%) | 26,9 $\pm$ 8,4 | 62,6 $\pm$ 8,3* | 1,64 $\pm$ 0,06* | 22,9 $\pm$ 3,0*          |

Como se observa en la tabla, la edad fue similar en ambos grupos, sin embargo, los hombres tuvieron un mayor peso, altura e IMC. Del total de 157 voluntarios, 144 fueron de raza caucásica, 11 voluntarios de origen latino, 1 mestizo y 1 de raza negra.

Algunos de los 157 voluntarios sanos participaron en más de un estudio: 1 sujeto participó en cuatro ensayos clínicos, 1 sujeto participó en tres y 17 sujetos participaron en dos, los restantes 138 participaron en un único ensayo clínico. Durante el desarrollo de los estudios hubo 19 voluntarios (5 hombres y 14 mujeres) que abandonaron o fueron excluidos por parte del equipo investigador, lo que supone el 12,1% de la población total que solo realizaron un periodo. Los motivos de abandono fueron: vómitos en las 2 h posteriores a la administración de la medicación (47,4%), motivos personales (42,1%) u otras RAM (10,5%).

### 1.2 Características genotípicas

Del total de la población de 157 voluntarios sanos, 148 dieron su consentimiento informado para el sub-estudio farmacogenético, de los cuales 85 fueron hombres y 63 mujeres.

En la tabla 13 se muestran las frecuencias genotípicas de la población de voluntarios sanos. Todas las variantes analizadas cumplieron el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p \geq 0,05$ ,  $\chi^2$  test), excepto la variante *CYP2D6*\*7 ya que no encontramos ningún sujeto portador de la misma. Los 148 sujetos fueron genotipados para todas las variantes excepto para *CYP3A4*\*20 (N=146) y para los polimorfismos de los receptores (Taq1A, C957T, Ser9Gly, T102C, His452Tyr y -759C/T) en los que se genotipó a 144 sujetos por falta de volumen de muestra.

**Tabla 13.** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados en la población de 148 voluntarios sanos. Se muestra la frecuencia absoluta (N) y relativa (%).

| Genotipo  | N   | Frecuencia (%) |
|---|-----|----------------|
| <b><i>CYP2D6</i> (*1, *3, *4, *5, *6, *9, duplicación *1xN, *4xN)</b> |     |                |
| *1/*1   | 76  | 51,4           |
| *1/*3   | 4   | 2,7            |
| *1/*4   | 43  | 29,1           |
| *1/*5   | 7   | 4,7            |
| *1/*6   | 1   | 0,7            |
| *1/*9   | 6   | 4,1            |
| *3/*3   | 1   | 0,7            |
| *4/*4   | 2   | 1,4            |
| *1x2/*1   | 6   | 4,1            |
| *1x2/*4   | 1   | 0,7            |
| *1x3/*1   | 1   | 0,7            |
| <b><i>CYP2D6</i> Fenotipo</b>   |     |                |
| PM  | 3   | 2,0            |
| IM  | 61  | 41,2           |
| EM  | 77  | 52,0           |
| UM  | 7   | 4,7            |
| <b><i>CYP3A4</i> (*1, *20, *22)</b>                                   |     |                |
| *1/*1   | 141 | 95,3           |
| *1/*20  | 1   | 0,7            |
| *1/*22  | 6   | 4,1            |
| <b><i>CYP3A5</i> (*1, *3)</b>   |     |                |
| *1/*1   | 5   | 3,4            |
| *1/*3   | 34  | 23,0           |
| *3/*3   | 109 | 73,6           |
| <b><i>ABCB1</i> (C3435T)</b>  |     |                |
| C/C   | 40  | 27,0           |
| C/T   | 72  | 48,6           |
| T/T   | 36  | 24,3           |
| <b><i>ABCB1</i> (C1236T)</b>  |     |                |
| C/C   | 48  | 32,4           |
| C/T   | 75  | 50,7           |
| T/T   | 25  | 16,9           |

Tabla 13. Continuación.

| Genotipo                 | N   | Frecuencia (%) |
|--------------------------|-----|----------------|
| <b>ABCB1 (G2677T/A)</b>  |     |                |
| A/A                      | 22  | 14,9           |
| A/T                      | 1   | 0,7            |
| A/C                      | 73  | 49,3           |
| C/T                      | 3   | 2,0            |
| C/C                      | 49  | 33,1           |
| <b>DRD2 (Taq1A)</b>      |     |                |
| A1/A1                    | 4   | 2,8            |
| A1/A2                    | 41  | 28,5           |
| A2/A2                    | 99  | 68,8           |
| <b>DRD2 (C957T)</b>      |     |                |
| C/C                      | 23  | 16             |
| C/T                      | 72  | 50             |
| T/T                      | 49  | 34             |
| <b>DRD3 (Ser9Gly)</b>    |     |                |
| Ser/Ser                  | 67  | 46,5           |
| Ser/Gly                  | 67  | 46,5           |
| Gly/Gly                  | 10  | 6,9            |
| <b>HTR2A (T102C)</b>     |     |                |
| C/C                      | 49  | 34             |
| C/T                      | 60  | 41,7           |
| T/T                      | 35  | 24,3           |
| <b>HTR2A (His452Tyr)</b> |     |                |
| C/C                      | 114 | 79,2           |
| C/T                      | 30  | 20,8           |
| <b>HTR2C (-759C/T)</b>   |     |                |
| C/C-C*                   | 108 | 75,0           |
| C/T                      | 22  | 15,3           |
| T/T-T*                   | 14  | 9,7            |

\*En hombres porque este gen se encuentra en el cromosoma X.

### 1.2.1 Comparación de las frecuencias alélicas frente a otras poblaciones caucásicas

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados se encuentran reflejadas en la tabla 14. En general, las frecuencias de nuestra población fueron similares a las descritas previamente para la población caucásica e ibérica en la base de datos del Proyecto 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org>) así como las de otros estudios realizados en población caucásica. No obstante, hubo algún caso en el que encontramos diferencias significativas. La frecuencia del alelo \*4 del gen *CYP2D6* fue menor en nuestra población si la comparamos con la descrita en población caucásica pero, sin embargo, fue muy similar a la descrita en población española (Menoyo et al.

2006). El porcentaje de alelos activos duplicados (2,7%) fue similar a lo descrito con anterioridad (Menoyo et al. 2006) mientras que no encontramos ningún sujeto portador del alelo \*4 duplicado así como tampoco ningún portador del alelo \*7. Analizando el fenotipo del CYP2D6, sorprende la baja frecuencia de PMs en nuestra población (2%) frente a lo descrito previamente (en torno a un 8-10%) (Llerena et al. 2007). En el sentido opuesto, la frecuencia de IMs en nuestra población fue mayor a lo descrito anteriormente.

También encontramos diferencias en la frecuencia del alelo *CYP3A4*\*22 cuando lo comparamos con población caucásica pero no cuando lo comparamos con población española del Proyecto 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org>), siendo la frecuencia de este alelo menor en población española que caucásica. Asimismo, la frecuencia del alelo *CYP3A5*\*3 fue ligeramente inferior en nuestra población en comparación con la caucásica y española (Gervasini et al. 2005).

La distribución del alelo T del polimorfismo C3435T (gen *ABCB1*) también fue diferente en nuestra población con respecto a la caucásica puesto que fue ligeramente inferior, estas diferencias no se encontraron cuando se analizó frente a población española (Bernal et al. 2003). La frecuencia del alelo T del polimorfismo C1236T y de los alelos A y T del polimorfismo trialélico G2677T/A fueron similares a las descritas por el Proyecto 1000 Genomas y otros autores (Kroetz et al. 2003; Zwisler et al. 2012).

El alelo T del polimorfismo C957T del gen *DRD2* fue más frecuente en nuestra población que en la caucásica (Huertas et al. 2012). No encontramos diferencias en las frecuencias alélicas para el resto de polimorfismos de receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos.

**Tabla 14.** Frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados en nuestra población en comparación con las de otras poblaciones. Para el gen *CYP2D6* se muestran también las frecuencias de los 4 fenotipos metabolizadores. Los datos se muestran en porcentaje (%).

| Genotipo          | Aripiprazol | CEU/IBS   | Otros estudios    | P-valor  |
|-------------------|-------------|-----------|-------------------|--|
| CYP2D6            |             |           |                   |  |
| *3                | 2,0         | 2,0/0,9   | 0,95 <sup>A</sup> | 0,974/0,053/0,065                                      |
| *4                | 16,2        | 22,7/14,5 | 13,8 <sup>A</sup> | <b>0,008</b> /0,402/0,228                              |
| *5                | 2,4         | ND        | 3,33 <sup>A</sup> | 0,355  |
| *6                | 0,3         | 2,0/0,5   | 0,95 <sup>A</sup> | 0,041/1,000/0,381                                      |
| *7                | 0,0         | 0,0/0,0   | 0,0 <sup>A</sup>  | No significativo                                       |
| *9                | 2,0         | ND        | 2,38 <sup>A</sup> | 0,690  |
| *1x2              | 2,4         | ND        | 1,9 <sup>A</sup>  | 0,558  |
| *1x3              | 0,3         | ND        | ND                | ND   |
| *4x2              | 0,0         | ND        | 0,47 <sup>A</sup> | No significativo                                       |
| CYP2D6 Fenotipo   |             |           |                   |  |
| PM                | 2,0         | ND        | 8,5 <sup>B</sup>  | <b>0,005</b>   |
| IM                | 41,2        | ND        | 33,1 <sup>B</sup> | <b>0,036</b>   |
| EM                | 52,0        | ND        | 52,1 <sup>B</sup> | 0,986  |
| UM                | 4,7         | ND        | 6,3 <sup>B</sup>  | 0,432  |
| CYP3A4            |             |           |                   |  |
| *20               | 0,3         | ND        | 1,2 <sup>C</sup>  | 0,197  |
| *22               | 2,0         | 4,5/3,7   | 5,3 <sup>D</sup>  | <b>0,040</b> /0,127/ <b>0,012</b>                      |
| CYP3A5            |             |           |                   |  |
| *3                | 85,1        | 96/92,5   | 91,0 <sup>E</sup> | <b>&lt;0,001</b> / <b>&lt;0,001</b> / <b>&lt;0,001</b> |
| ABCB1 (C3435T)    |             |           |                   |  |
| T                 | 48,6        | 56,6/46,3 | 48,4 <sup>F</sup> | <b>0,006</b> /0,418/0,932                              |
| ABCB1 (C1236T)    |             |           |                   |  |
| T                 | 42,2        | 42,9/37,9 | 45,9 <sup>G</sup> | 0,816/0,125/0,201                                      |
| ABCB1 (G2677T/A)  |             |           |                   |  |
| A                 | 39,9        | 42,9/36,4 | 36,6 <sup>H</sup> | 0,518/0,296/0,266                                      |
| T                 | 1,4         | 1,0/2,3   | 2,5 <sup>H</sup>  |  |
| DRD2 (Taq1A)      |             |           |                   |  |
| A1                | 17,0        | 20,2/14,5 | 21,0 <sup>I</sup> | 0,178/0,226/0,097                                      |
| DRD2 (C957T)      |             |           |                   |  |
| T                 | 59,0        | 50,0/57,9 | 59,2 <sup>J</sup> | <b>0,002</b> /0,698/0,953                              |
| DRD3 (Ser9Gly)    |             |           |                   |  |
| Gly               | 30,2        | 34,3/29,0 | 32,0 <sup>I</sup> | 0,144/0,651/0,515                                      |
| HTR2A (T102C)     |             |           |                   |  |
| T                 | 45,1        | 45,5/47,2 | 45,0 <sup>K</sup> | 0,902/0,484/0,962                                      |
| HTR2A (His452Tyr) |             |           |                   |  |
| T                 | 10,4        | 7,6/10,7  | 11,0 <sup>K</sup> | 0,071/0,876/0,752                                      |
| HTR2C (-759C/T)   |             |           |                   |  |
| T                 | 17,4        | 16,8/15,6 | ND                | 0,799/0,410  |

**CEU e IBS:** población caucásica de ascendencia europea y población española de la fase 3 del Proyecto 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org>), respectivamente.

**Referencias tabla:** <sup>A</sup> Menoyo et al. 2006. <sup>B</sup> Llerena et al. 2007. <sup>C</sup> Apellániz-Ruiz et al. 2015.

<sup>D</sup> Elens et al. 2013. <sup>E</sup> Gervasini et al. 2005. <sup>F</sup> Bernal et al. 2003. <sup>G</sup> Kroetz et al. 2003.

<sup>H</sup> Zwisler et al. 2012. <sup>I</sup> Güzey et al. 2011. <sup>J</sup> Huertas et al. 2012. <sup>K</sup> López-Rodríguez et al. 2013.

### 1.2.2 Diferencias en las frecuencias genotípicas frente al sexo

En la tabla 15 se muestran las frecuencias genotípicas con respecto al sexo. Las frecuencias genotípicas no difirieron entre sexos excepto para el polimorfismo His452Tyr del gen *HTR2A* en el que se observó una mayor frecuencia del genotipo C/C entre los varones ( $P=0,007$ ). Lo mismo ocurrió con el polimorfismo -759C/T, del gen *HTR2C* que se encuentra en el cromosoma X, cuyo genotipo C fue más predominante entre los varones mientras que el genotipo C/T fue inexistente entre la población masculina ( $P < 0,001$ ). Al analizar las frecuencias alélicas de este polimorfismo también encontramos diferencias entre hombres y mujeres, siendo la frecuencia del alelo C superior en hombres (85,7% versus 78,33% en mujeres;  $P=0,021$ ).

**Tabla 15.** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados en la población de 148 voluntarios sanos según el sexo. Para el gen *CYP2D6* se muestran también las frecuencias de los 4 fenotipos metabolizadores. Se muestra la frecuencia absoluta (N) y el porcentaje (%) y el p-valor para la prueba  $\chi^2$ .

| Genotipo  | Hombres (N=85) |            | Mujeres (N=63) |            | P-valor  |
|---|----------------|------------|----------------|------------|----------|
|   | N              | Porcentaje | N              | Porcentaje | $\chi^2$ |
| CYP2D6 (*3, *4, *5, *6, *9, duplicación *1xN, *4xN-9) |                |            |                |            |          |
| *1/*1   | 43             | 50,6       | 33             | 52,4       | 0,932    |
| *1/*3   | 3              | 3,5        | 1              | 1,6        |          |
| *1/*4   | 26             | 30,6       | 17             | 27         |          |
| *1/*5   | 3              | 3,5        | 4              | 6,3        |          |
| *1/*6   | 1              | 1,2        | 0              | 0          |          |
| *1/*9   | 4              | 4,7        | 2              | 3,2        |          |
| *3/*3   | 0              | 0,0        | 1              | 1,6        |          |
| *4/*4   | 1              | 1,2        | 1              | 1,6        |          |
| *1x2/*1   | 3              | 3,5        | 3              | 4,8        |          |
| *1x2/*4   | 1              | 1,2        | 0              | 0,0        |          |
| *1x3/*1   | 0              | 0,0        | 1              | 1,6        |          |
| CYP2D6 Fenotipo                                       |                |            |                |            |          |
| PM  | 1              | 1,2        | 2              | 3,2        | 0,649    |
| IM  | 37             | 43,5       | 24             | 38,1       |          |
| EM  | 44             | 51,8       | 33             | 52,4       |          |
| UM  | 3              | 3,5        | 4              | 6,3        |          |
| CYP3A4 (*20, *22)                                     |                |            |                |            |          |
| *1/*1   | 79             | 92,9       | 62             | 98,4       | 0,308    |
| *1/*20  | 1              | 1,2        | 0              | 0          |          |
| *1/*22  | 5              | 5,9        | 1              | 1,6        |          |

Tabla 15. Continuación.

| Genotipo          | Hombres (N=85) |            | Mujeres (N=63) |            | P-valor  |
|-------------------|----------------|------------|----------------|------------|----------|
|                   | N              | Porcentaje | N              | Porcentaje | $\chi^2$ |
| CYP3A5 (*3)       |                |            |                |            |          |
| *1/*1             | 3              | 3,5        | 2              | 3,2        | 0,086    |
| *1/*3             | 14             | 16,5       | 20             | 31,7       |          |
| *3/*3             | 68             | 80         | 41             | 65,1       |          |
| ABCB1 (C3435T)    |                |            |                |            |          |
| C/C               | 27             | 31,8       | 13             | 20,6       | 0,102    |
| C/T               | 35             | 41,2       | 37             | 58,7       |          |
| T/T               | 23             | 27,1       | 13             | 20,6       |          |
| ABCB1 (C1236T)    |                |            |                |            |          |
| C/C               | 32             | 37,6       | 16             | 25,4       | 0,272    |
| C/T               | 39             | 45,9       | 36             | 57,1       |          |
| T/T               | 14             | 16,5       | 11             | 17,5       |          |
| ABCB1 (G2677T/A)  |                |            |                |            |          |
| A/A               | 13             | 15,3       | 9              | 14,3       | 0,460    |
| A/T               | 0              | 0,0        | 1              | 1,6        |          |
| A/C               | 38             | 44,7       | 35             | 55,6       |          |
| C/T               | 2              | 2,4        | 1              | 1,6        |          |
| C/C               | 32             | 37,6       | 17             | 27         |          |
| DRD2 (Taq1A)      |                |            |                |            |          |
| A1/A1             | 2              | 2,4        | 2              | 3,3        | 0,664    |
| A1/A2             | 22             | 26,2       | 19             | 31,7       |          |
| A2/A2             | 71,4           | 71,4       | 39             | 65         |          |
| DRD2 (C957T)      |                |            |                |            |          |
| C/C               | 16             | 19         | 7              | 11,7       | 0,482    |
| C/T               | 41             | 48,8       | 31             | 51,7       |          |
| T/T               | 27             | 32,1       | 22             | 36,7       |          |
| DRD3 (Ser9Gly)    |                |            |                |            |          |
| Ser/Ser           | 44             | 52,4       | 23             | 38,3       | 0,247    |
| Ser/Gly           | 35             | 41,7       | 32             | 53,3       |          |
| Gly/Gly           | 5              | 6,0        | 5              | 8,3        |          |
| HTR2A (T102C)     |                |            |                |            |          |
| C/C               | 30             | 35,7       | 19             | 31,7       | 0,589    |
| C/T               | 32             | 38,1       | 28             | 46,7       |          |
| T/T               | 22             | 26,2       | 13             | 21,7       |          |
| HTR2A (His452Tyr) |                |            |                |            |          |
| C/C               | 73             | 86,9       | 41             | 68,3       | 0,007    |
| C/T               | 11             | 13,1       | 19             | 31,7       |          |
| HTR2C (-759C/T)   |                |            |                |            |          |
| C/C-C*            | 72             | 85,7       | 36             | 60         | <0,001   |
| C/T               | 0              | 0,0        | 22             | 36,7       |          |
| T/T-T*            | 12             | 14,3       | 2              | 3,3        |          |

\*En hombres porque este gen se encuentra en el cromosoma X.

## **2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO**

En relación con los principales resultados de este apartado se han publicado los siguientes artículos:

**Belmonte C, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T, Talegón M, Sánchez-Rojas SD, Abad-Santos F. Evaluation of the Relationship Between Pharmacokinetics and the Safety of Aripiprazole and Its Cardiovascular Effects in Healthy Volunteers. J Clin Psychopharmacol. 2016 Dec;36(6):608-614.**

**Belmonte C, Ochoa D, Román M, Saiz-Rodríguez M, Wojnicz A, Gómez-Sánchez CI, Martín-Vílchez S, Abad-Santos F. Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms on Pharmacokinetics and Safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 Jun;122(6):596-605.**

**Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Jiang-Zheng C, Koller D, Mejía G, Zubiaur P, Wojnicz A, Abad-Santos F. Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on pharmacokinetics of antipsychotics and antidepressants. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 May 3. doi: 10.1111/bcpt.13031. [Epub ahead of print]**



## 2.1 Datos de biodisponibilidad y bioequivalencia

En la tabla 16 se desglosan por estudio los datos de  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$  según la formulación (test o referencia) así como los resultados del análisis de bioequivalencia. Los 6 estudios fueron bioequivalentes ya que el intervalo de confianza al 90% para el ratio test/referencia estuvo dentro de los límites 80-125 establecidos por la EMA y FDA.

**Tabla 16.** Datos de biodisponibilidad y resultados del análisis de bioequivalencia de los 6 estudios realizados.

| ARI-1 (comprimidos convencionales)   |                  |        |          |        |                                |
|--------------------------------------|------------------|--------|----------|--------|--------------------------------|
| Parámetros                           | Aripiprazol test |        | Abilify® |        | Bioequivalencia                |
| farmacocinéticos                     | Media            | DS     | Media    | DS     | Ratio test/referencia (90% CI) |
| $AUC_{0-t}$ (h*ng/ml)                | 1461,05          | 333,50 | 1314,95  | 395,52 | 107,33 (101,64 – 113,34)       |
| $C_{max}$ (ng/ml)                    | 42,79            | 7,19   | 39,19    | 11,20  | 111,59 (101,28 – 122,95)       |
| ARI-2 (comprimidos bucodispersables) |                  |        |          |        |                                |
| Parámetros                           | Aripiprazol test |        | Abilify® |        | Bioequivalencia                |
| farmacocinéticos                     | Media            | DS     | Media    | DS     | Ratio test/referencia (90% CI) |
| $AUC_{0-t}$ (h*ng/ml)                | 1435,30          | 330,75 | 1339,62  | 387,00 | 103,07 (99,25-107,03)          |
| $C_{max}$ (ng/ml)                    | 48,40            | 10,22  | 45,55    | 10,70  | 105,04 (97,12-113,60)          |
| ARI-3 (comprimidos convencionales)   |                  |        |          |        |                                |
| Parámetros                           | Aripiprazol test |        | Abilify® |        | Bioequivalencia                |
| farmacocinéticos                     | Media            | DS     | Media    | DS     | Ratio test/referencia (90% CI) |
| $AUC_{0-t}$ (h*ng/ml)                | 1570,25          | 428,76 | 1462,58  | 378,95 | 107,59 (103,48 – 111,86)       |
| $C_{max}$ (ng/ml)                    | 54,16            | 15,36  | 46,37    | 13,97  | 114,30 (104,96 – 124,46)       |
| ARI-4 (comprimidos bucodispersables) |                  |        |          |        |                                |
| Parámetros                           | Aripiprazol test |        | Abilify® |        | Bioequivalencia                |
| farmacocinéticos                     | Media            | DS     | Media    | DS     | Ratio test/referencia (90% CI) |
| $AUC_{0-t}$ (h*ng/ml)                | 1799,83          | 403,25 | 1753,96  | 426,57 | 103,08 (100,30 – 105,94)       |
| $C_{max}$ (ng/ml)                    | 56,10            | 12,97  | 50,49    | 13,77  | 112,79 (105,96 – 120,05)       |
| ARI-5 (comprimidos convencionales)   |                  |        |          |        |                                |
| Parámetros                           | Aripiprazol test |        | Abilify® |        | Bioequivalencia                |
| farmacocinéticos                     | Media            | DS     | Media    | DS     | Ratio test/referencia (90% CI) |
| $AUC_{0-t}$ (h*ng/ml)                | 1757,21          | 432,81 | 1735,73  | 400,96 | 101,46 (97,35 – 105,75)        |
| $C_{max}$ (ng/ml)                    | 50,61            | 7,80   | 51,29    | 11,73  | 100,63 (94,21 – 107,49)        |
| ARI-6 (comprimidos bucodispersables) |                  |        |          |        |                                |
| Parámetros                           | Aripiprazol test |        | Abilify® |        | Bioequivalencia                |
| farmacocinéticos                     | Media            | DS     | Media    | DS     | Ratio test/referencia (90% CI) |
| $AUC_{0-t}$ (h*ng/ml)                | 1544,11          | 348,26 | 1480,40  | 422,90 | 107,64 (100,42 – 115,37)       |
| $C_{max}$ (ng/ml)                    | 48,48            | 9,75   | 45,82    | 13,45  | 110,00 (101,89 – 118,75)       |

**Abreviaturas:** DS, desviación típica; 90% CI, intervalos de confianza al 90%.

Además, también analizamos las diferencias en biodisponibilidad según la forma farmacéutica, es decir, si existían diferencias entre los comprimidos convencionales y los bucodispersables (tabla 17). La biodisponibilidad entre ambas formas farmacéuticas fue similar, siendo ambas bioequivalentes entre sí al encontrarse dentro de los límites 80-125.

**Tabla 17.** Datos de biodisponibilidad y resultados del análisis de bioequivalencia de los comprimidos convencionales en comparación con los bucodispersables.

| Comparación comprimidos convencionales vs bucodispersables |                  |       |                    |        |                                |
|--|------------------|-------|--------------------|--------|--------------------------------|
| Parámetros farmacocinéticos                                | C.Convencionales |       | C.Bucodispersables |        | Bioequivalencia                |
|  | Media            | DS    | Media              | DS     | Ratio test/referencia (90% CI) |
| AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/ml)                               | 1510,9           | 420,8 | 1554,3             | 444,14 | 102,22 (93,84-111,36)          |
| C <sub>max</sub> (ng/ml)                                   | 46,0             | 13,2  | 47,6               | 12,9   | 103,76 (96,09-112,03)          |

## 2.2 Parámetros farmacocinéticos

En la tabla 18, se muestran los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol, el metabolito activo y la suma de ambos obtenidos en la población de estudio.

**Tabla 18.** Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol, dehidro-aripiprazol y la suma de ambos en la población estudiada. Se muestra media  $\pm$  desviación típica.

| Parámetros farmacocinéticos            | Aripiprazol (N=157)  | Dehidro-aripiprazol (N=103) | ARI+DHARI (N=103)    |
|--|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL)           | 1616,0 $\pm$ 432,7   | 396,3 $\pm$ 141,8           | 2030,0 $\pm$ 424,4   |
| AUC <sub>0-t</sub> /DP (ng·h·mg/mL·kg) | 10813,5 $\pm$ 2363,5 | 2706,2 $\pm$ 884,0          | 13665,1 $\pm$ 2155,1 |
| C <sub>max</sub> (ng/mL)               | 48,8 $\pm$ 11,2      | 7,0 $\pm$ 2,4               | 56,7 $\pm$ 11,5      |
| C <sub>max</sub> /DP (ng·mg/mL·kg)     | 331,6 $\pm$ 66,2     | 47,8 $\pm$ 14,9             | 385,9 $\pm$ 70,4     |
| T <sub>max</sub> (h)                   | 3,2 $\pm$ 1,7        |                             |                      |
| T <sub>1/2</sub> (h)                   | 52,6 $\pm$ 23,4      |                             |                      |
| V <sub>d</sub> /F (L/kg)               | 4,2 $\pm$ 0,9        |                             |                      |
| Cl/F (mL/h·kg)                         | 63,6 $\pm$ 23,1      |                             |                      |

**Abreviaturas:** ARI, aripiprazol; AUC<sub>0-t</sub>/DP, AUC<sub>0-t</sub> ajustada por dosis/peso; C<sub>max</sub>/DP, C<sub>max</sub> ajustada por dosis/peso; DHARI, dehidro-aripiprazol.

### 2.3 Influencia del sexo en la farmacocinética

El sexo influyó en los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol, las mujeres presentaron mayores valores de  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$  y  $V_d/F$  (tabla 19). Sin embargo, el  $AUC_{0-t}$  ajustado por dosis/peso ( $AUC_{0-t}/DP$ ) y la  $C_{max}$  ajustada por dosis/peso ( $C_{max}/DP$ ) fueron mayores en los hombres. No se encontraron diferencias por sexo en la  $T_{max}$  ni en el  $Cl/peso$ .

**Tabla 19.** Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol con respecto al sexo. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

| Aripiprazol                    |                      |                         |
|--------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Parámetros farmacocinéticos    | Hombres (N=89)       | Mujeres (N=68)          |
| $AUC_{0-t}$ (ng·h/mL)          | 1547,5 $\pm$ 397,6   | 1705,7 $\pm$ 462,4      |
| $AUC_{0-t}/DP$ (ng·h·mg/mL·kg) | 11039,3 $\pm$ 2119,1 | 10518,0 $\pm$ 2636,6**† |
| $C_{max}$ (ng/mL)              | 46,0 $\pm$ 9,8       | 52,5 $\pm$ 12,0***      |
| $C_{max}/DP$ (ng·mg/mL·kg)     | 340,2 $\pm$ 63,0     | 320,3 $\pm$ 69,0**†     |
| $T_{max}$ (h)                  | 3,0 $\pm$ 1,6        | 3,4 $\pm$ 1,7           |
| $T_{1/2}$ (h)                  | 47,7 $\pm$ 17,9      | 58,9 $\pm$ 28,0**†      |
| $V_d/F$ (L/kg)                 | 3,9 $\pm$ 0,7        | 4,6 $\pm$ 0,9***†       |
| $Cl/F$ (mL/h·kg)               | 63,3 $\pm$ 19,6      | 63,9 $\pm$ 27,1         |

\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$  versus hombres. †Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple.

**Abreviaturas:**  $AUC_{0-t}/DP$ ,  $AUC_{0-t}$  ajustada por dosis/peso;  $C_{max}/DP$ ,  $C_{max}$  ajustada por dosis/peso.

Como se muestra en la tabla 20, no se encontraron diferencias significativas entre sexos en la farmacocinética del metabolito, excepto en la  $C_{max}$  ( $P= 0,037$ ) que fue mayor en mujeres; sin embargo al ajustar por dosis/peso se perdió la significación estadística ( $P= 0,232$ ). Para la suma de ambas sustancias activas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos ya que tanto el  $AUC_{0-t}$  ( $P= 0,014$ ) como la  $C_{max}$  ( $P= 0,001$ ) fueron mayores en el sexo femenino; tras ajustar por dosis/peso ambos parámetros siguieron siendo estadísticamente significativos pero ambos fueron mayores en los hombres que en las mujeres ( $P= 0,011$ ;  $P= 0,016$ , respectivamente). El ratio dehidro-aripiprazol/aripiprazol no difirió entre sexos (0,25 $\pm$ 0,10 en hombres versus 0,26 $\pm$ 0,11 en mujeres;  $P=0,466$ ).

**Tabla 20.** Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol y de la suma de aripiprazol y dehidro-aripiprazol con respecto al sexo. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

| Parámetros farmacocinéticos    | Dehidro-aripiprazol |                    | Aripiprazol+Dehidro-aripiprazol |                       |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------|
|                                | Hombres (N=58)      | Mujeres (N=45)     | Hombres (N=58)                  | Mujeres (N=45)        |
| $AUC_{0-t}$ (ng·h/mL)          | 369,5 $\pm$ 127,4   | 430,9 $\pm$ 153,0  | 1942,4 $\pm$ 414,0              | 2143,0 $\pm$ 415,1*   |
| $AUC_{0-t}/DP$ (ng·h·mg/mL·kg) | 2802,6 $\pm$ 919,   | 2581,9 $\pm$ 830,1 | 14153,4 $\pm$ 2157,5            | 13035,7 $\pm$ 2004,2* |
| $C_{max}$ (ng/mL)              | 6,5 $\pm$ 2,2       | 7,6 $\pm$ 2,6*     | 53,4 $\pm$ 10,1                 | 61,0 $\pm$ 11,7***    |
| $C_{max}/DP$ (ng·mg/mL·kg)     | 49,4 $\pm$ 15,7     | 45,6 $\pm$ 13,8    | 401,0 $\pm$ 72,1                | 366,4 $\pm$ 63,6*     |

\*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01 y \*\*\*p $\leq$ 0,001 versus hombres.

**Abreviaturas:**  $AUC_{0-t}/DP$ ,  $AUC_{0-t}$  ajustada por dosis/peso;  $C_{max}/DP$ ,  $C_{max}$  ajustada por dosis/peso.

## 2.4 Influencia de los polimorfismos genéticos en la farmacocinética

A continuación se muestran los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol, dehidro-aripiprazol y la suma de ambos según los genotipos de los polimorfismos analizados.

### 2.4.1 Influencia del CYP2D6 en la farmacocinética de aripiprazol

El fenotipo metabolizador del CYP2D6 se asoció con cambios en los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol (tabla 21). A medida que el número de alelos activos del *CYP2D6* disminuía, el  $AUC_{0-t}$  ( $P<0,001$ ) y  $T_{1/2}$  ( $P<0,001$ ) fueron mayores mientras que el  $CL/F$  fue menor ( $P<0,001$ ). La  $C_{max}$  también se vio afectada en el mismo sentido por el fenotipo del CYP2D6 ( $P=0,045$ ) pero al ajustar por dosis/peso se perdió la significación estadística ( $P=0,078$ ). No encontramos diferencias entre los EM y UM, sin embargo, sí que se apreció una tendencia ya que los sujetos UM presentaron menores valores de  $AUC_{0-t}$  y  $T_{1/2}$  y mayor  $CL/F$  en comparación con los sujetos EM.

**Tabla 21.** Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol (media $\pm$ desviación típica) según el fenotipo del CYP2D6.

| Fenotipo CYP2D6 | $AUC_{0-t}$ (ng·h/mL)    | $C_{max}$ (ng/mL) | $T_{1/2}$ (h)        | $CL/F$ (mL/h·kg)        |
|-----------------|--------------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|
| PM (N=3)        | 2247,3 $\pm$ 615,1 **&†  | 55,6 $\pm$ 20,9   | 76,7 $\pm$ 10,3 *&†  | 36,7 $\pm$ 5,8 ***&&&†  |
| IM (N=61)       | 1804,3 $\pm$ 393,7 ***&† | 52,0 $\pm$ 11,3 † | 60,6 $\pm$ 23,5 ***† | 53,3 $\pm$ 18,1 ***&&&† |
| EM (N=77)       | 1497,9 $\pm$ 337,3       | 46,8 $\pm$ 10,3   | 45,8 $\pm$ 15,7      | 70,4 $\pm$ 18,7         |
| UM (N=7)        | 1337,0 $\pm$ 245,2       | 50,7 $\pm$ 9,2    | 39,4 $\pm$ 11,5      | 84,3 $\pm$ 29,9         |

\* p $\leq$ 0,05, \*\* p $\leq$ 0,01 y \*\*\* p $\leq$ 0,001 vs EM y & p $\leq$ 0,05, && p $\leq$ 0,01 y &&& p $\leq$ 0,001 vs UM. † Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple. Se muestran p-valores para  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$  ajustadas por dosis/peso.

La farmacocinética del metabolito activo también fue dependiente del fenotipo del CYP2D6, disminuyendo tanto el  $AUC_{0-t}$  ( $P<0,001$ ) como la  $C_{max}$  ( $P<0,001$ ) a medida que el número de los alelos activos del CYP2D6 disminuía (tabla 22). Además, el fenotipo del CYP2D6 afectó al ratio del AUC de dehidro-aripirazol/aripirazol ( $P<0,001$ ) y al  $AUC_{0-t}$  de la suma de ambos compuestos ( $P=0,018$ ), aunque al ajustar este último parámetro las diferencias ya no fueron significativas ( $P=0,106$ ) (tabla 22). Al igual que ocurría con aripirazol, aunque los sujetos UM presentaron mayor  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$  de dehidro-aripirazol en comparación con los EM estas diferencias no fueron significativas ( $P=0,303$  y  $P=0,533$ , respectivamente). No obstante, el ratio sí que fue significativamente mayor en UM que EM.

**Tabla 22.** Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripirazol, de la suma de éste con aripirazol y del ratio de ambos compuestos según el fenotipo del CYP2D6. Se muestra la media  $\pm$  desviación típica.

| Fenotipo<br>CYP2D6 | Dehidro-aripirazol                          |  | ARI+DHARI                       |                      | Ratio DHARI/ARI                                |
|--------------------|---|--|---------------------------------|----------------------|--|
|                    | $AUC_{0-t}$<br>(ng·h/ml)                    | $C_{max}$<br>(ng/ml)                   | $AUC_{0-t}$<br>(ng·h/ml)        | $C_{max}$<br>(ng/ml) |  |
| PM (N=3)           | 291,8 $\pm$ 43,1 <sup>&amp;</sup>           | 6,0 $\pm$ 1,3                          | 2539,1 $\pm$ 632,7 <sup>†</sup> | 61,6 $\pm$ 21,1      | 0,14 $\pm$ 0,04 <sup>*&amp;&amp;&amp;†</sup>   |
| IM (N=43)          | 340,3 $\pm$ 116,8 <sup>***&amp;&amp;†</sup> | 6,1 $\pm$ 2,2 <sup>**&amp;&amp;†</sup> | 2133,8 $\pm$ 409,8              | 57,1 $\pm$ 10,0      | 0,20 $\pm$ 0,07 <sup>***&amp;&amp;&amp;†</sup> |
| EM (N=50)          | 431,9 $\pm$ 142,3                           | 7,6 $\pm$ 2,4                          | 1932,9 $\pm$ 401,8              | 55,7 $\pm$ 12,3      | 0,29 $\pm$ 0,10                                |
| UM (N=7)           | 531,2 $\pm$ 143,7                           | 8,9 $\pm$ 2,6                          | 1868,2 $\pm$ 344,8              | 59,6 $\pm$ 10,3      | 0,40 $\pm$ 0,09 <sup>*†</sup>                  |

**Abreviaturas:** ARI, aripirazol; DHARI, dehidro-aripirazol.

\*  $p\leq 0,05$ , \*\*  $p\leq 0,01$  y \*\*\*  $p\leq 0,001$  vs EM y <sup>&</sup>  $p\leq 0,05$ , <sup>&&</sup>  $p\leq 0,01$  y <sup>&&&</sup>  $p\leq 0,001$  vs UM.

† Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple. Se muestran p-valores para  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$  ajustadas por dosis/peso.

#### 2.4.2 Influencia del CYP3A4 en la farmacocinética de aripirazol

El CYP3A4 no afectó los parámetros farmacocinéticos de aripirazol ni de su metabolito activo (tablas 23 y 24). Sin embargo, se observó una tendencia ya que el único sujeto portador del alelo \*20 presentó una mayor  $AUC_{0-t}$  de aripirazol, una menor AUC del metabolito y un ratio del AUC dehidro-aripirazol/aripirazol muy bajo. Además, tal y como se esperaba, la  $T_{1/2}$  fue más larga en el único sujeto \*1/\*20 mientras que el aclaramiento fue menor. Sin embargo debido a la imposibilidad de realizar el análisis estadístico con un grupo con una N=1 se incluyó a este sujeto entre

los \*1/\*22 y, a pesar de la tendencias anteriormente nombradas, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 23.** Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol (media  $\pm$  desviación típica) según el genotipo del CYP3A4.

| Genotipo CYP3A4 | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL) | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (h) | Cl/F (mL/h·kg)  |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------|
| *1/*1 (N=141)   | 1627,2 $\pm$ 409,2           | 49,3 $\pm$ 11,3          | 51,8 $\pm$ 20,4      | 63,8 $\pm$ 21,5 |
| *1/*22 (N=6)    | 1706,7 $\pm$ 311,8           | 48,1 $\pm$ 4,1           | 59,9 $\pm$ 29,4      | 55,0 $\pm$ 15,2 |
| *1/*20 (N=1)    | 1829,8                       | 53,1                     | 67,0                 | 40,0            |

**Tabla 24.** Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol, de la suma de éste con aripiprazol y del ratio de ambos compuestos según el genotipo del CYP3A4. Se muestra la media  $\pm$  desviación típica.

| Genotipo CYP3A4 | Dehidro-aripiprazol          |                          | DHARI+ARI                    |                          | Ratio DHARI/ARI |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------|
|                 | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/ml) | C <sub>max</sub> (ng/ml) | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/ml) | C <sub>max</sub> (ng/ml) |                 |
| *1/*1 (N=96)    | 394,3 $\pm$ 138,4            | 7,0 $\pm$ 2,4            | 2021,4 $\pm$ 435,9           | 56,8 $\pm$ 11,8          | 0,25 $\pm$ 0,10 |
| *1/*22 (N=6)    | 459,4 $\pm$ 185,6            | 7,9 $\pm$ 3,1            | 2166,1 $\pm$ 202,2           | 56,0 $\pm$ 5,8           | 0,29 $\pm$ 0,16 |
| *1/*20 (N=1)    | 212,4                        | 4,0                      | 2042,2                       | 57,1                     | 0,12            |

**Abreviaturas:** ARI, aripiprazol; DHARI, dehidro-aripiprazol.

### 2.4.3 Influencia del CYP3A5 en la farmacocinética de aripiprazol

No se encontró asociación de los diferentes genotipos del CYP3A5 con los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol ni dehidro-aripiprazol (tablas 25 y 26). Sin embargo, el polimorfismo CYP3A5\*3 se asoció con el ratio dehidro-aripiprazol/aripiprazol ya que los sujetos \*1/\*1 y \*1/\*3 presentaron mayores ratios en comparación con los homocigotos mutados (\*3/\*3) ( $P=0,019$ ).

**Tabla 25.** Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol (media  $\pm$  desviación típica) de acuerdo a los diferentes genotipos del CYP3A5.

| Genotipo CYP3A5 | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL) | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (h) | CL/F (mL/h·kg)  |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------|
| *1/*1 (N=5)     | 2000,9 $\pm$ 747,7           | 58,5 $\pm$ 17,9          | 51,4 $\pm$ 25,9      | 72,0 $\pm$ 34,9 |
| *1/*3 (N=34)    | 1671,3 $\pm$ 335,7           | 49,9 $\pm$ 8,2           | 56,9 $\pm$ 24,2      | 60,9 $\pm$ 19,4 |
| *3/*3 (N=109)   | 1602,5 $\pm$ 399,4           | 48,7 $\pm$ 11,4          | 50,8 $\pm$ 19,3      | 63,7 $\pm$ 21,3 |

**Tabla 26.** Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol, de la suma de éste con aripiprazol y del ratio de ambos compuestos según el genotipo del *CYP3A5*. Se muestra la media  $\pm$  desviación típica.

| Genotipo<br><i>CYP3A5</i> | Dehidro-aripiprazol             |                             | DHARI+ARI                       |                             | Ratio<br>DHARI/ARI           |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                           | AUC <sub>0-t</sub><br>(ng·h/ml) | C <sub>max</sub><br>(ng/ml) | AUC <sub>0-t</sub><br>(ng·h/ml) | C <sub>max</sub><br>(ng/ml) |                              |
| <b>*1/*1 (N=5)</b>        | 488,5 $\pm$ 106,5               | 8,7 $\pm$ 1,7               | 2489,5 $\pm$ 715,1              | 67,3 $\pm$ 17,7             | 0,28 $\pm$ 0,12              |
| <b>*1/*3 (N=26)</b>       | 424,1 $\pm$ 132,7               | 7,5 $\pm$ 2,3               | 2100,3 $\pm$ 304,6              | 57,8 $\pm$ 9,5              | 0,27 $\pm$ 0,11 <sup>†</sup> |
| <b>*3/*3 (N=72)</b>       | 379,8 $\pm$ 144,5               | 6,7 $\pm$ 2,5               | 1972,7 $\pm$ 421,1              | 55,6 $\pm$ 11,4             | 0,25 $\pm$ 0,10              |

**Abreviaturas:** ARI, aripiprazol; DHARI, dehidro-aripiprazol.

<sup>†</sup> Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple.

#### 2.4.4 Influencia del *ABCB1* en la farmacocinética de aripiprazol

Como se muestra en la tabla 27 los polimorfismos en el gen de la glicoproteína-P no ejercieron influencia sobre los principales parámetros farmacocinéticos de aripiprazol, el AUC<sub>0-t</sub> y la C<sub>max</sub>. Sin embargo, el aclaramiento de este fármaco se vio afectado por los polimorfismos C1236T ( $P=0,023$ ) y G2677T/A ( $P=0,037$ ). En ambos casos los sujetos con genotipo C/C presentaron mayores valores de este parámetro en comparación con los sujetos T/T C1236T y A/A G2677T/A. Aunque el resto de hallazgos no fueron estadísticamente significativos, sí que existió una tendencia en los sujetos T/T y C/T para los tres polimorfismos a presentar mayores valores de AUC<sub>0-t</sub>, C<sub>max</sub>, y T<sub>1/2</sub> y menor Cl/F de aripiprazol.

**Tabla 27.** Parámetros farmacocinéticos de aripiprazol (media  $\pm$  desviación típica) de acuerdo a los diferentes genotipos de los 3 polimorfismos analizados en el gen *ABCB1*.

| Polimorfismo/Genotipo | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL) | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (h) | Cl/F (mL/h·kg)                |
|-----------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------------|
| <b>C3435T</b>         |                              |                          |                      |                               |
| <b>C/C (N=40)</b>     | 1514,8 $\pm$ 355,2           | 47,0 $\pm$ 10,0          | 46,9 $\pm$ 15,9      | 66,5 $\pm$ 19,0               |
| <b>C/T (N=72)</b>     | 1664,4 $\pm$ 413,2           | 49,9 $\pm$ 11,3          | 51,9 $\pm$ 19,2      | 63,6 $\pm$ 22,2               |
| <b>T/T (N=36)</b>     | 1696,6 $\pm$ 420,5           | 50,7 $\pm$ 11,8          | 58,9 $\pm$ 26,4      | 59,2 $\pm$ 22,1               |
| <b>C1236T</b>         |                              |                          |                      |                               |
| <b>C/C (N=48)</b>     | 1497,8 $\pm$ 353,6           | 47,4 $\pm$ 10,2          | 50,0 $\pm$ 16,8      | 64,8 $\pm$ 19,2* <sup>†</sup> |
| <b>C/T (N=75)</b>     | 1665,2 $\pm$ 381,9           | 49,2 $\pm$ 11,0          | 50,5 $\pm$ 19,8      | 65,1 $\pm$ 21,3*              |
| <b>T/T (N=25)</b>     | 1788,8 $\pm$ 490,5           | 53,1 $\pm$ 12,5          | 61,8 $\pm$ 27,5      | 55,2 $\pm$ 24,2               |

\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs genotipo de referencia (C3435T T/T, C1236T T/T, G2677T/A C/C).

<sup>†</sup> Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple. Se muestran p-valores para AUC y C<sub>max</sub> ajustadas por dosis/peso.

Tabla 27. Continuación.

| Polimorfismo/Genotipo   | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/mL) | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (h) | CL/F (mL/h·kg) |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------|
| <b>G2677T/A</b>         |                              |                          |                      |                |
| <b>C/C (N=49)</b>       | 1511,0±333,1                 | 47,7±9,7                 | 46,4±14,3            | 67,6±19,7      |
| <b>C/A+ C/T (N=76)</b>  | 1676,0±405,4                 | 49,2±11,2                | 53,6±20,7            | 62,2±20,9      |
| <b>A/A + A/T (N=23)</b> | 1743,2±486,4                 | 53,0±13,1                | 60,4±28,5            | 57,8±25,2*     |

\*p≤0,05, \*\*p≤0,01 y \*\*\*p≤0,001 vs genotipo de referencia (C3435T T/T, C1236T T/T, G2677T/A C/C).

† Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple. Se muestran p-valores para AUC y C<sub>max</sub> ajustadas por dosis/peso.

Sin embargo, los polimorfismos C1236T y G2677T/A afectaron tanto el AUC<sub>0-t</sub> de dehidro-aripiprazol, con una significación estadística de  $P=0,039$  y  $P=0,021$ , respectivamente, como la C<sub>max</sub> ( $P=0,037$  y  $P=0,036$ , respectivamente) (tabla 28). Ambos parámetros fueron mayores en los sujetos C/C en comparación con el resto. Además, el ratio del AUC de dehidro-aripiprazol/aripiprazol se vio afectado también por los polimorfismos G2677T/A ( $P=0,026$ ) y C3435T ( $P=0,050$ ), siendo mayor en ambos casos en los sujetos C/C.

**Tabla 28.** Parámetros farmacocinéticos de dehidro-aripiprazol, de la suma de éste con aripiprazol y del ratio de ambos compuestos según el genotipo del CYP3A5. Se muestra la media ± desviación típica.

| Polimorfismo/Genotipo | Dehidro-aripiprazol          |                          | DHARI+ARI                    |                          | Ratio      |
|-----------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------|
|                       | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/ml) | C <sub>max</sub> (ng/ml) | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/ml) | C <sub>max</sub> (ng/ml) | DHARI/ARI  |
| <b>C3435T</b>         |                              |                          |                              |                          |            |
| <b>C/C (N=33)</b>     | 417,4±151,1                  | 7,3±2,5                  | 1930,2±395,8                 | 54,4±11,8                | 0,29±0,11* |
| <b>C/T (N=44)</b>     | 405,7±141,4                  | 7,2±2,5                  | 2092,4±443,1                 | 58,0±10,9                | 0,25±0,10  |
| <b>T/T (N=26)</b>     | 353,6±125,7                  | 6,3±2,1                  | 2051,1±419,8                 | 57,5±11,9                | 0,22±0,10  |
| <b>C1236T</b>         |                              |                          |                              |                          |            |
| <b>C/C (N=38)</b>     | 400,2±135,8*†                | 7,1±2,3*†                | 1914,8±376,2                 | 54,3±10,4                | 0,28±0,10  |
| <b>C/T (N=47)</b>     | 418,2±147,9                  | 7,4±2,6                  | 2106,1±436,0                 | 58,2±11,6                | 0,26±0,10  |
| <b>T/T (N=18)</b>     | 330,8±124,1                  | 5,9±2,1                  | 2074,6±459,0                 | 57,9±12,9                | 0,21±0,10  |

**Abreviaturas:** ARI, aripiprazol; DHARI, dehidro-aripiprazol.

\*p≤0,05, \*\*p≤0,01 y \*\*\*p≤0,001 versus genotipo de referencia (C3435T T/T, C1236T T/T, G2677T/A C/C).

† Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple. Para el AUC y la C<sub>max</sub> se muestra el p-valor ajustado para la variable ajustada por dosis/peso.



Tabla 28. Continuación.

| Polimorfismo/Genotipo | Dehidro-aripiprazol          |                          | DHARI+ARI                    |                          | Ratio      |
|-----------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------|
|                       | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/ml) | C <sub>max</sub> (ng/ml) | AUC <sub>0-t</sub> (ng·h/ml) | C <sub>max</sub> (ng/ml) | DHARI/ARI  |
| G2677T/A              |                              |                          |                              |                          |            |
| C/C (N=37)            | 422,6±140,9*                 | 7,4±2,4                  | 1,942,7±363,8                | 55,1±9,8                 | 0,29±0,11  |
| C/A+ C/T (N=50)       | 396,3±142,4                  | 7,1±2,5                  | 2,079,2±446,9                | 57,2±12,1                | 0,25±0,10  |
| A/A + A/T (N=16)      | 335,4±131,3*                 | 6,0±2,2*                 | 2,078,1±474,8                | 59,1±13,2                | 0,21±0,11* |

**Abreviaturas:** ARI, aripiprazol; DHARI, dehidro-aripiprazol.

\*p≤0,05, \*\*p≤0,01 y \*\*\*p≤0,001 versus genotipo de referencia (C3435T T/T, C1236T T/T, G2677T/A C/C).

† Estadísticamente significativo en análisis de regresión múltiple. Para el AUC y la C<sub>max</sub> se muestra el p-valor ajustado para la variable ajustada por dosis/peso.

Además, se realizó un modelo para determinar la relación entre los 3 polimorfismos del mismo gen y sólo el polimorfismo C1236T se asoció con las variables dependientes y no hubo interacciones significativas entre los tres polimorfismos. Por este motivo, solo este SNP se introdujo en el análisis de regresión múltiple.

#### 2.4.5 Análisis farmacocinético de regresión múltiple

Para el estudio conjunto de los factores que influyen en la farmacocinética de aripiprazol se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple tal y como se ha descrito en la sección “Material y Métodos”, los resultados se muestran en la tabla 29.

El fenotipo del CYP2D6 y el sexo ejercieron influencia sobre todos los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol, excepto sobre el aclaramiento que se vio afectado por el SNP C1236T del gen *ABCB1* y el CYP2D6 (que fue menor en los sujetos T/T del SNP C1236T y para los PM e IM del CYP2D6). Las mujeres presentaron mayores valores de T<sub>1/2</sub> y V<sub>d</sub>/F y menores valores de AUC/DP y C<sub>max</sub>/DP de aripiprazol. En los sujetos PM para el CYP2D6 los valores de AUC/DP, C<sub>max</sub>/DP y T<sub>1/2</sub> de aripiprazol fueron mayores.

De la misma forma, el AUC y la C<sub>max</sub> de dehidro-aripiprazol se vieron influenciadas por el SNP C1236T del gen *ABCB1* y el CYP2D6, siendo menores ambas en los sujetos T/T del SNP C1236T y PM e IM del CYP2D6.

Teniendo en cuenta la suma de ambos compuestos, el AUC se vio afectada por el fenotipo del CYP2D6 y por el sexo (que fue mayor en hombres y en los sujetos PM e IM) mientras que la C<sub>max</sub> sólo se vio afectada por el sexo siendo más elevada en hombres. El fenotipo del CYP2D6 y el genotipo del CYP3A5 afectaron al ratio AUC

dehidro-aripiprazol/aripiprazol, que fue menor en los sujetos PM e IM (CYP2D6) y los \*3\*/3 (CYP3A5).

**Tabla 29.** Coeficientes de regresión (B) múltiple del análisis farmacocinético. Se muestran los coeficientes para los logaritmos neperianos de las variables dependientes (excepto para el AUC del ratio dehidro-aripiprazol/aripiprazol).

| Coeficientes de regresión múltiple |                         |           |        |        |        |        |       |        |        |        |        |
|------------------------------------|-------------------------|-----------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Variable dependiente               | R <sup>2</sup> ajustada | Constante | Sexo   | C1236T |        | CYP3A5 |       | CYP3A4 | CYP2D6 |        |        |
|                                    |                         |           |        | T/T    | C/T    | *1/*1  | *1/*3 |        | PM     | IM     | UM     |
| AUC/DP (ARI)                       | 0,210                   | 9,241     | -0,074 |        |        |        |       |        | 0,385  | 0,146  | -0,035 |
| C <sub>max</sub> /DP (ARI)         | 0,057                   | 5,783     | -0,078 |        |        |        |       |        | 0,125  | 0,083  | 0,090  |
| T <sub>1/2</sub>                   | 0,211                   | 3,696     | 0,182  |        |        |        |       |        | 0,516  | 0,267  | -0,160 |
| V/F (ARI)                          | 0,237                   | 1,378     | 0,167  |        |        |        |       |        | -0,203 | -0,061 | 0,006  |
| CL/F (ARI)                         | 0,250                   | -2,674    |        | -0,159 | -0,007 |        |       |        | -0,664 | -0,273 | 0,180  |
| AUC/DP (DHARI)                     | 0,213                   | 7,999     |        | -0,200 | -0,052 |        |       |        | -0,352 | -0,235 | 0,235  |
| C <sub>max</sub> /DP (DHARI)       | 0,196                   | 3,963     |        | -0,233 | -0,053 |        |       |        | -0,197 | -0,211 | 0,088  |
| AUC/DP (ARI+DHARI)                 | 0,094                   | 9,522     | -0,087 |        |        |        |       |        | 0,239  | 0,042  | 0,010  |
| C <sub>max</sub> /DP (ARI+DHARI)   | 0,056                   | 5,977     | -0,090 |        |        |        |       |        |        |        |        |
| AUC ratio DHARI/ARI                | 0,373                   | 0,281     |        |        |        | 0,058  | 0,047 |        | -0,195 | -0,101 | 0,112  |

**Abreviaturas:** ARI, aripiprazol; DHARI, dehidro-aripiprazol.

Genotipo o fenotipo de referencia: C1236T, C/C; CYP3A5, \*3/\*3; CYP2D6, EM.

Categoría de referencia para el sexo: mujeres.

### 3. ANÁLISIS FARMACODINÁMICO

Los principales resultados de este apartado se han publicado en el siguiente artículo:

**Belmonte C, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T, Talegón M, Sánchez-Rojas SD, Abad-Santos F. Evaluation of the Relationship Between Pharmacokinetics and the Safety of Aripiprazole and Its Cardiovascular Effects in Healthy Volunteers. J Clin Psychopharmacol. 2016 Dec;36(6):608-614.**

#### 3.1 Análisis de la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos

En nuestro estudio el aripiprazol tuvo un efecto hipotensor: la TAS disminuyó un máximo de 9,3 mmHg y la TAD disminuyó un máximo de 6,2 mmHg (tabla 30). Encontramos una relación inversamente proporcional entre el AUC de aripiprazol y la TAS (coeficiente  $\beta$  no estandarizado=-0,005,  $p=0,0005$ ), lo mismo ocurrió con la TAD (coeficiente  $\beta$  no estandarizado=-0,002,  $p=0,012$ ).

**Tabla 30.** Efecto de aripiprazol en la tensión arterial sistólica (TAS), tensión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardiaca (FC) e intervalo QT corregido (QTc). Se muestran resultados sobre la población total, expresado como media  $\pm$  desviación estándar.

|                      | Pre-dosis        | Post-dosis         |                     |                     |                     |                     |
|----------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                      |                  | 0,5h               | 2h                  | 4h                  | 6h                  | 8h                  |
| TAS (mmHg)           | 116,5 $\pm$ 11,0 | 110,3 $\pm$ 9,8*** | 107,2 $\pm$ 11,1*** | 109,6 $\pm$ 9,8***  | 111,6 $\pm$ 10,7*** | 111,5 $\pm$ 10,5*** |
| TAD (mmHg)           | 65,0 $\pm$ 7,2   | 62,4 $\pm$ 6,5**   | 58,9 $\pm$ 6,7***   | 59,5 $\pm$ 5,8***   | 58,8 $\pm$ 5,1***   | 59,0 $\pm$ 5,3***   |
| FC (lpm)             | 62,9 $\pm$ 10,0  |                    |                     | 67,4 $\pm$ 11,0***  |                     | 75,0 $\pm$ 11,8***  |
| QT <sub>c</sub> (ms) | 400,1 $\pm$ 18,9 |                    |                     | 409,2 $\pm$ 24,6*** |                     | 409,2 $\pm$ 23,3*** |

\*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01 y \*\*\*p $\leq$ 0,001 comparados con los valores pre-dosis.

De forma similar y como se puede observar en la tabla 30 se produjo un aumento estadísticamente significativo en la FC a las 4 h post-dosis (4,5 lpm, p=0,001) que fue incluso mayor a las 8 h post-dosis (12,1 lpm, p<0,0001) comparados con los valores basales, es decir, previos a recibir la medicación. Además, existió una relación directamente proporcional entre el AUC de aripiprazol y la FC (coeficiente  $\beta$  no estandarizado=-0,005, p=0,024). Sin embargo, no encontramos relación de ningún de los parámetros de tensión arterial ni de FC con la otra variable farmacocinética analizada, la C<sub>max</sub> de aripiprazol.

Con respecto al intervalo QTc hubo un aumento de 9,1 ms a las 4 h y 8 h post-dosis con respecto a la medida basal (tabla 30). De acuerdo a los criterios de la guía ICH para la evaluación de la prolongación del intervalo QTc (ICH 2005) es relevante un valor absoluto del intervalo QTc mayor a 450 ms o un aumento con respecto al valor basal mayor a 30 ms. En nuestro estudio esta anomalía electrocardiográfica se produjo a las 4 h post-dosis en 18 voluntarios y a las 8 h post-dosis en 24 voluntarios. Un valor absoluto del intervalo QTc mayor a 500 ms o un aumento con respecto al valor basal mayor a 60 ms se considera como un incremento del riesgo de sufrir una arritmia patológica conocida como “Torsión de puntas” (Roden, 2004; Shah, 2002). En nuestro estudio hubo 3 sujetos en los que el incremento del QTc con respecto al valor basal fue mayor de 60 ms. Las concentraciones plasmáticas de aripiprazol no estuvieron relacionadas con aumentos en el intervalo QTc a las 4 h post-dosis (coeficiente  $\beta$  no estandarizado=-0,239, p=0,265) ni a las 8 h post-dosis (coeficiente  $\beta$  no estandarizado=-0,247, p=0,329). Tampoco se encontró relación entre la prolongación

del QTc (como RAM) y mayores concentraciones de aripiprazol a las 4 h y 8 h post-dosis ni con el AUC ni la  $C_{max}$ .

Ni el metabolito activo ni la suma de aripiprazol con el metabolito se relacionaron con ninguna de las variables estudiadas.

### 3.1.1 Influencia del sexo en la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos

En cuanto al sexo, encontramos diferencias significativas entre hombres y mujeres en la TAS, TAD, QTc y FC en todos los tiempos de medida. La TAS y TAD fue mayor en los hombres mientras que la FC y el QTc fueron mayores en las mujeres (tabla 31). Sin embargo, el efecto farmacodinámico de aripiprazol, es decir, las diferencias de los valores post-dosis con respecto a los valores basales, fueron similares entre ambos sexos, excepto para la reducción máxima de la TAD que fue ligeramente más pronunciada en el caso de los hombres ( $-11,6 \pm 8,5$  vs  $-9,1 \pm 7,2$ ;  $P=0,005$ ).

**Tabla 31.** Efecto de aripiprazol en la tensión arterial sistólica (TAS), tensión arterial diastólica (TAD), frecuencia cardiaca (FC) e intervalo QT corregido (QTc). Se muestran resultados según sexo, expresado como media  $\pm$  desviación estándar.

|               | Sexo    | Pre-dosis                       | Post-dosis                      |                                 |                                 |                                 |                                 |
|---------------|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|               |         |                                 | 0,5h                            | 2h                              | 4h                              | 6h                              | 8h                              |
| TAS<br>(mmHg) | Hombres | 121,2 $\pm$ 9,9                 | 114,9 $\pm$ 8,0 <sup>***</sup>  | 112,1 $\pm$ 10,4 <sup>***</sup> | 114,2 $\pm$ 8,6 <sup>***</sup>  | 116,8 $\pm$ 9,3                 | 117,2 $\pm$ 8,6 <sup>*</sup>    |
|               | Mujeres | 110,3 $\pm$ 9,4 <sup>***</sup>  | 104,4 $\pm$ 8,8 <sup>****</sup> | 100,8 $\pm$ 8,4 <sup>****</sup> | 103,5 $\pm$ 7,6 <sup>****</sup> | 104,8 $\pm$ 8,5 <sup>****</sup> | 104,0 $\pm$ 7,6 <sup>****</sup> |
| TAD<br>(mmHg) | Hombres | 66,8 $\pm$ 7,5                  | 64,0 $\pm$ 6,7                  | 60,2 $\pm$ 7,2 <sup>***</sup>   | 60,6 $\pm$ 6,3 <sup>***</sup>   | 59,9 $\pm$ 5,4 <sup>***</sup>   | 60,4 $\pm$ 5,5 <sup>***</sup>   |
|               | Mujeres | 62,5 $\pm$ 6,1 <sup>***</sup>   | 60,2 $\pm$ 5,6 <sup>***</sup>   | 57,2 $\pm$ 5,5 <sup>****</sup>  | 58,0 $\pm$ 4,7 <sup>****</sup>  | 57,3 $\pm$ 4,3 <sup>****</sup>  | 57,2 $\pm$ 4,3 <sup>****</sup>  |
| FC (lpm)      | Hombres | 59,9 $\pm$ 9,1                  |                                 |                                 | 64,3 $\pm$ 9,9 <sup>*</sup>     |                                 | 72,0 $\pm$ 11,2 <sup>***</sup>  |
|               | Mujeres | 66,8 $\pm$ 9,9 <sup>***</sup>   |                                 |                                 | 71,4 $\pm$ 11,1 <sup>***</sup>  |                                 | 79,0 $\pm$ 11,3 <sup>****</sup> |
| QTc (ms)      | Hombres | 391,1 $\pm$ 16,4                |                                 |                                 | 399,2 $\pm$ 20,9 <sup>*</sup>   |                                 | 400,2 $\pm$ 22,1 <sup>**</sup>  |
|               | Mujeres | 411,8 $\pm$ 15,3 <sup>***</sup> |                                 |                                 | 422,2 $\pm$ 23,2 <sup>***</sup> |                                 | 421,0 $\pm$ 19,3 <sup>***</sup> |

\* $p < 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$  comparadas con los hombres, en el mismo momento de medida.

### 3.1.2 Influencia de los polimorfismos genéticos en la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos

Los polimorfismos genéticos estudiados se asociaron principalmente con diferencias en los valores de QTc post-tratamiento. Para el polimorfismo C957T (gen *DRD2*) los valores de QTc post-tratamiento fueron mayores en los sujetos T/T ( $422,4 \pm 26,4$

mmHg) seguidos de los sujetos C/T ( $414,1 \pm 27,7$  mmHg;  $P=0,035$ ) y C/C ( $409,2 \pm 25,9$  mmHg;  $P=0,015$ ). Asimismo el polimorfismo His452Tyr del gen *HTR2A* también se asoció con diferencias en los valores de QTc post-tratamiento ( $P=0,021$ ) siendo mayor este parámetro en los sujetos C/T ( $423,5 \pm 26,9$  mmHg) con respecto a los C/C ( $414,5 \pm 27,2$  mmHg). A pesar de que los valores post-tratamiento de QTc difirieron entre los diferentes genotipos de ambos polimorfismos, no se encontró asociación con un aumento o disminución de los valores de este parámetro, excepto con el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* ya que encontramos diferencias estadísticamente significativas en el aumento del QTc entre los genotipos A1/A1 y A1/A2 ( $P=0,038$ ), siendo casi 3 veces mayor el aumento del QTc en los sujetos homocigotos mutados en comparación con los heterocigotos ( $35,1 \pm 41,5$  versus  $13,4 \pm 20,2$ ;  $P=0,049$ ).

Por último, el polimorfismo T102C del gen *HTR2A* se asoció con diferencias en los valores de TAD post-tratamiento ( $P=0,014$ ). La TAD en los sujetos C/C fue mayor ( $55,9 \pm 6,5$ ) en comparación con los C/T ( $54,2 \pm 5,0$ ;  $P=0,039$ ) y T/T ( $53,8 \pm 4,5$ ;  $P=0,030$ ). A pesar de que se encontraron estas diferencias post-tratamiento y que no existían diferencias en los valores de TAD basales, no se encontraron diferencias en la disminución de la TAD ( $P=0,434$ ).

### 3.1.3 Análisis de regresión lineal múltiple: tensión arterial y parámetros electrocardiográficos

Una vez realizado el análisis bivalente llevamos a cabo un análisis de regresión lineal múltiple con el fin de investigar si el sexo, los parámetros farmacocinéticos y los polimorfismos genéticos influían en los cambios farmacodinámicos a nivel global.

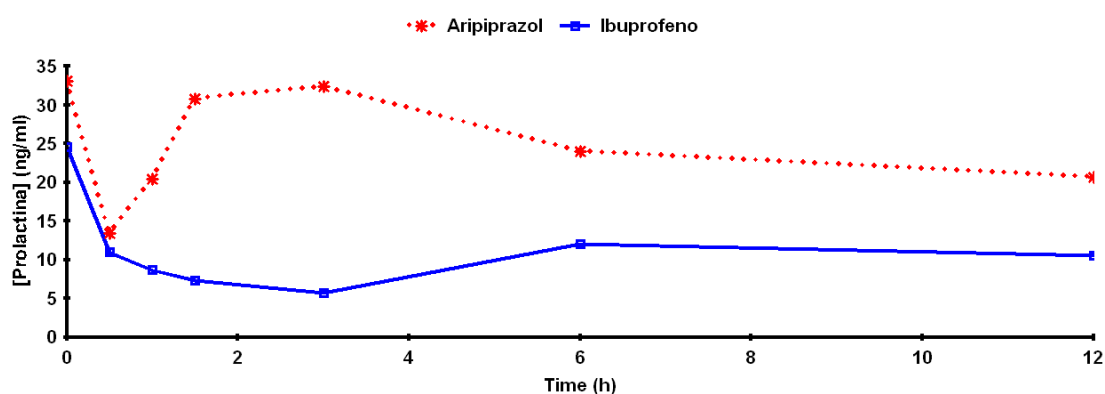
La disminución de la TAD estuvo influenciada por el sexo ( $P=0,001$ ) y el polimorfismo C957T del gen *DRD2* ( $P=0,038$ ). En los hombres el descenso en esta variable fue menor (Coeficiente B no estandarizado= 2,93) mientras que en los sujetos T/T para el polimorfismo C957T fue mayor (Coeficiente B no estandarizado= -1,96). El ajuste del modelo, no obstante, fue bastante pobre ( $R^2$  corregida= 0,035).

El aumento del QTc fue dependiente únicamente del polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* ( $P=0,041$ ), produciéndose un aumento del QTc en 18,4 unidades en los sujetos A1/A1 con respecto a los A2/A2. Sin embargo, el ajuste del modelo fue limitado ( $R^2$

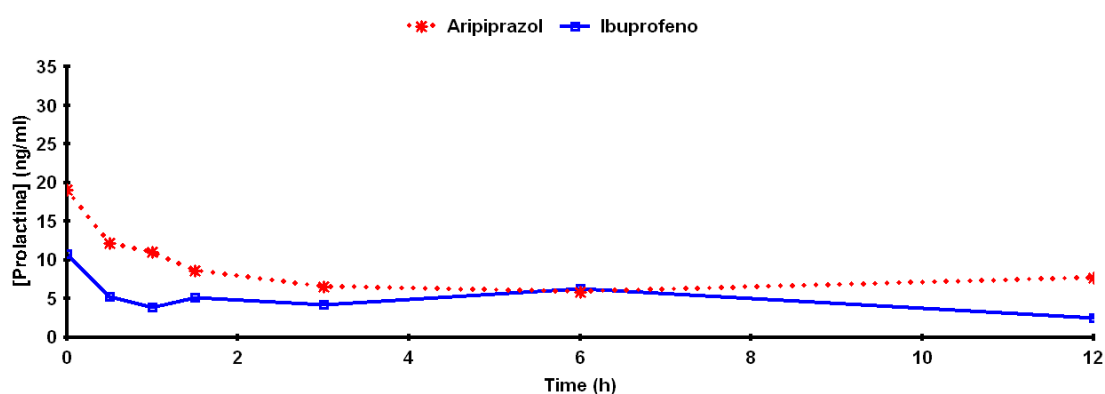
corregida= 0,010). Ninguna de las variables estudiadas influyó en el aumento de la FC observada ni en la disminución de la TAS tras el análisis multivariante.

### 3.2 Análisis de la concentración de prolactina en plasma

En primer lugar, se realizó una comparación de las curvas de concentraciones plasmáticas de prolactina versus tiempo obtenidas con aripiprazol y con un fármaco que no eleva los niveles de prolactina como el ibuprofeno. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto (figura 16 y 17) que existen claras diferencias entre ambos fármacos, produciéndose un aumento de los niveles de prolactina con el aripiprazol con respecto al ibuprofeno, especialmente en mujeres. En todos los sujetos se produjo un pico máximo de prolactina coincidiendo con el despertar (antes de la administración del fármaco), que se estabilizó 12 h post-dosis.



**Figura 16.** Concentración de prolactina versus tiempo en la población femenina del estudio de aripiprazol en comparación con ibuprofeno.



**Figura 17.** Concentración de prolactina versus tiempo en la población masculina del estudio de aripiprazol en comparación con ibuprofeno.

Muestra de ello es que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros analizados, excepto para la concentración basal de prolactina ( $C_0$ ), siendo el  $AUC_{0-12}$  ( $P=0,016$ ),  $C_{max}$  ( $P=0,029$ ) y  $C_{12}$  ( $P=0,027$ ), mucho mayores en el caso de aripiprazol (tabla 32). También observamos que el sexo ejerció influencia en los niveles de prolactina (tabla 32) puesto que todas las variables analizadas fueron muy superiores en el sexo femenino con respecto al masculino [ $AUC_{0-12}$  ( $P=0,002$ ),  $C_0$  ( $P=0,007$ ),  $C_{max}$  ( $P=0,008$ ) y  $C_{12}$  ( $P=0,003$ )]. Si estudiamos la interacción del sexo con el fármaco, observamos que el único parámetro que estuvo afectado fue la  $C_{max}$  ( $P=0,037$ ) ya que aunque en ambos fármacos este parámetro fue mayor en mujeres que en hombres, en el estudio de ibuprofeno apenas existen diferencias mientras que en el de aripiprazol la  $C_{max}$  en mujeres fue 4 veces superior a la de los hombres.

**Tabla 32.** Parámetros cinéticos relacionados con la secreción de prolactina de acuerdo al fármaco analizado y sexo. Se muestra media  $\pm$  desviación estándar.

| Fármaco               | $AUC_{0-12}$ (ng·h/mL) | $C_0$ (ng/mL) <sup>‡</sup> | $C_{max}$ (ng/mL) | $C_{12}$ (ng/mL)  |
|-----------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Aripiprazol</b>    |                        |                            |                   |                   |
| <b>Hombres (N=14)</b> | 88,0 $\pm$ 89,2*       | 19,1 $\pm$ 9,2             | 10,2 $\pm$ 9,8*   | 7,6 $\pm$ 8,1*    |
| <b>Mujeres (N=17)</b> | 298,2 $\pm$ 167,8*#    | 33,1 $\pm$ 20,0#           | 41,8 $\pm$ 27,6*# | 20,7 $\pm$ 12,6*# |
| <b>Total (N=31)</b>   | 203,3 $\pm$ 172,5*     | 26,6 $\pm$ 17,2            | 27,5 $\pm$ 26,5*  | 14,8 $\pm$ 12,5*  |
| <b>Ibuprofeno</b>     |                        |                            |                   |                   |
| <b>Hombres (N=6)</b>  | 57,7 $\pm$ 20,0        | 10,7 $\pm$ 6,3             | 9,5 $\pm$ 5,0     | 2,5 $\pm$ 0,8     |
| <b>Mujeres (N=6)</b>  | 121,7 $\pm$ 50,6#      | 24,6 $\pm$ 8,7#            | 13,6 $\pm$ 6,5#   | 10,5 $\pm$ 7,9#   |
| <b>Total (N=12)</b>   | 89,7 $\pm$ 49,6        | 17,7 $\pm$ 10,2            | 11,5 $\pm$ 5,9    | 6,5 $\pm$ 6,8     |

<sup>‡</sup> En el grupo de aripiprazol para los hombres la N de la  $C_0$  fue de 13 sujetos y para las mujeres de 15.

\*  $p<0,05$  versus ibuprofeno en el mismo grupo de sexo. #  $p<0,05$  versus hombres en el mismo fármaco.

El polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* no ejerció efecto sobre la secreción de prolactina durante el tratamiento con aripiprazol (tabla 33). A pesar de que observamos cierta tendencia en los sujetos portadores del alelo mutado A1 a tener mayores niveles de  $AUC_{0-12}$ ,  $C_{max}$  y  $C_{12}$  en comparación con los sujetos A2/A2, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Asimismo, tampoco encontramos diferencias significativas en el efecto de la interacción del factor sexo y del polimorfismo sobre la secreción de prolactina, o lo que es lo mismo, la secreción de prolactina se vio afectada

de la misma manera tanto en los sujetos portadores del alelo A1 como en los sujetos A2/A2 independientemente del sexo.

**Tabla 33.** Parámetros cinéticos relacionados con la secreción de prolactina durante el tratamiento con aripiprazol según el polimorfismo Taq1A (gen *DRD2*) y sexo. Se muestra media  $\pm$  desviación estándar.

| Fármaco                    | AUC <sub>0-12</sub> (ng·h/mL) | C <sub>0</sub> (ng/mL) <sup>#</sup> | C <sub>max</sub> (ng/mL) | C <sub>12</sub> (ng/mL) |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Portadores alelo A1</b> |                               |                                     |                          |                         |
| <b>Hombres (N=5)</b>       | 77,5 $\pm$ 26,4               | 20,6 $\pm$ 5,2                      | 12,6 $\pm$ 5,0           | 5,0 $\pm$ 2,4           |
| <b>Mujeres (N=8)</b>       | 311,4 $\pm$ 168,9             | 34,4 $\pm$ 27,5                     | 41,2 $\pm$ 22,0          | 24,4 $\pm$ 14,1         |
| <b>Total (N=13)</b>        | 221,4 $\pm$ 175,8             | 26,6 $\pm$ 17,2                     | 30,2 $\pm$ 22,4          | 16,9 $\pm$ 14,6         |
| <b>A2/A2</b>               |                               |                                     |                          |                         |
| <b>Hombres (N=9)</b>       | 93,9 $\pm$ 111,7              | 16,1 $\pm$ 12,2                     | 8,8 $\pm$ 11,7           | 9,1 $\pm$ 9,8           |
| <b>Mujeres (N=9)</b>       | 286,5 $\pm$ 176,1             | 28,4 $\pm$ 15,6                     | 42,4 $\pm$ 33,1          | 17,3 $\pm$ 10,8         |
| <b>Total (N=18)</b>        | 190,2 $\pm$ 174,0             | 22,3 $\pm$ 15,0                     | 25,6 $\pm$ 29,6          | 13,2 $\pm$ 10,9         |

<sup>#</sup>En los portadores del alelo A1 para las mujeres la N de la C<sub>0</sub> fue de 7. En sujetos A2/A2 la N de la C<sub>0</sub> fue 8 tanto para hombres como mujeres.

#### 4. SEGURIDAD Y TOLERABILIDAD

Durante el desarrollo del estudio no hubo RAM severas, serias o que comprometiesen la vida de los sujetos. En la tabla 34 se muestra la frecuencia de las diferentes RAM que se produjeron durante el estudio. Un total de 114 sujetos (72,6%) sufrieron al menos una RAM, siendo las más frecuentes el mareo (38,9%), las náuseas/vómitos (29,9%), la prolongación del QTc (20,4%) y la cefalea (18,5%). De acuerdo a la clasificación SOC las RAM más frecuentes fueron las neurológicas (51,0%) y las gastrointestinales (31,8%) (tabla 34). Para el análisis estadístico de seguridad sólo se tuvo en cuenta si se había producido una determinada RAM o no, sin contabilizar el número de veces que se desarrolló.



**Tabla 34.** Incidencia y frecuencia de todas las RAM tanto individualmente como agrupadas de acuerdo a la clasificación SOC.

| RAM                            | Total (N=157) |
|--------------------------------|---------------|
|                                | N (%)         |
| Cualquier RAM                  | 114 (72,6%)   |
| Mareo                          | 61 (38,9%)    |
| Náuseas/vómitos                | 47 (29,9%)    |
| Prolongación del intervalo QTc | 32 (20,4%)    |
| Cefalea                        | 29 (18,5%)    |
| Astenia                        | 10 (6,4%)     |
| Somnolencia                    | 12 (7,6%)     |
| Insomnio                       | 6 (3,8%)      |
| Síncope                        | 5 (3,2%)      |
| Dolor abdominal                | 3 (1,9%)      |
| Hipotensión                    | 3 (1,9%)      |
| Hipo                           | 2 (1,3%)      |
| Pesadillas                     | 2 (1,3%)      |
| Diarrea                        | 1 (0,6%)      |
| Gastroenteritis                | 1 (0,6%)      |
| Caída capilar                  | 1 (0,6%)      |
| Elevación enzimas hepáticas    | 1 (0,6%)      |
| Dolor lumbar                   | 1 (0,6%)      |
| Nerviosismo                    | 1 (0,6%)      |
| Poliuria                       | 1 (0,6%)      |
| Dificultad respiratoria        | 1 (0,6%)      |
| Taquicardia                    | 1 (0,6%)      |
| RAM según clasificación SOC    |               |
| Neurológicas                   | 80 (51,0%)    |
| Gastrointestinales             | 50 (31,8%)    |
| Cardiovasculares               | 37 (23,6%)    |
| Generales                      | 12 (7,6%)     |
| Psiquiátricas                  | 9 (5,7%)      |
| Genitourinarias                | 1 (0,6%)      |
| Respiratorias                  | 1 (0,6%)      |

#### 4.1 Influencia del sexo en las reacciones adversas

En nuestro estudio el sexo fue un factor influyente en el desarrollo de RAM (tabla 35). El porcentaje de mujeres que desarrollaron al menos una RAM fue mayor que el de los hombres (82,4% frente al 65,2%;  $P=0,017$ ) (tabla 35). El desarrollo de RAM gastrointestinales, especialmente náuseas/vómitos también fue mayor en el grupo femenino (41,2% frente a 21,3%;  $P=0,007$ ). La cefalea también fue más común entre las mujeres (25% frente al 13,5% de los hombres), sin embargo, esta diferencia no alcanzó la significación estadística ( $P=0,065$ ). La somnolencia, por el contrario, fue más frecuente en el grupo masculino (11,2% frente a 2,9% en el grupo femenino), estando esta diferencia en el límite de la significación estadística ( $P=0,053$ ). Además, la tasa de abandono se asoció con el sexo, siendo mayor en las mujeres que en los hombres (20,6% vs 5,6%;  $P= 0,006$ ).

**Tabla 35.** Diferencias según sexo en la incidencia y frecuencia de todas las RAM tanto individualmente como agrupadas de acuerdo a la clasificación SOC.

| RAM                                | Hombres (N=89) | Mujeres (N=68) | p-valor      |
|------------------------------------|----------------|----------------|--------------|
|                                    | N (%)          | N (%)          | p-valor      |
| <b>Cualquier RAM</b>               | 58 (65,2%)     | 56 (82,4%)     | <b>0,017</b> |
| <b>Mareo</b>                       | 30 (33,7)      | 31 (45,6%)     | 0,130        |
| <b>Náuseas/vómitos</b>             | 19 (21,3%)     | 28 (41,2%)     | <b>0,007</b> |
| <b>Prolongación QTc</b>            | 17 (19,1%)     | 15 (22,1%)     | 0,648        |
| <b>Cefalea</b>                     | 12 (13,5%)     | 17 (25,0%)     | 0,065        |
| <b>Astenia</b>                     | 3 (3,4%)       | 7 (10,3%)      | 0,103        |
| <b>Somnolencia</b>                 | 10 (11,2%)     | 2 (2,9%)       | 0,053        |
| <b>Insomnio</b>                    | 2 (2,2%)       | 4 (5,9%)       | 0,404        |
| <b>Síncope</b>                     | 4 (4,5%)       | 1 (1,5%)       | 0,390        |
| <b>Dolor abdominal</b>             | 1 (1,1%)       | 2 (2,9%)       | 0,579        |
| <b>Hipotensión</b>                 | 3 (3,4%)       | 0 (0,0%)       | 0,259        |
| <b>Hipo</b>                        | 0 (0,0%)       | 2 (2,9%)       | 0,103        |
| <b>Pesadillas</b>                  | 1 (1,1%)       | 1 (1,5%)       | 0,680        |
| <b>Diarrea</b>                     | 0 (0,0%)       | 1 (1,5%)       | 0,433        |
| <b>Gastroenteritis</b>             | 0 (0,0%)       | 1 (1,5%)       | 0,433        |
| <b>Caída capilar</b>               | 0 (0,0%)       | 1 (1,5%)       | 0,433        |
| <b>Elevación enzimas hepáticas</b> | 1 (1,1%)       | 0 (0,0%)       | 1,000        |
| <b>Dolor lumbar</b>                | 1 (1,1%)       | 0 (0,0%)       | 1,000        |
| <b>Nerviosismo</b>                 | 0 (0,0%)       | 1 (1,5%)       | 0,433        |

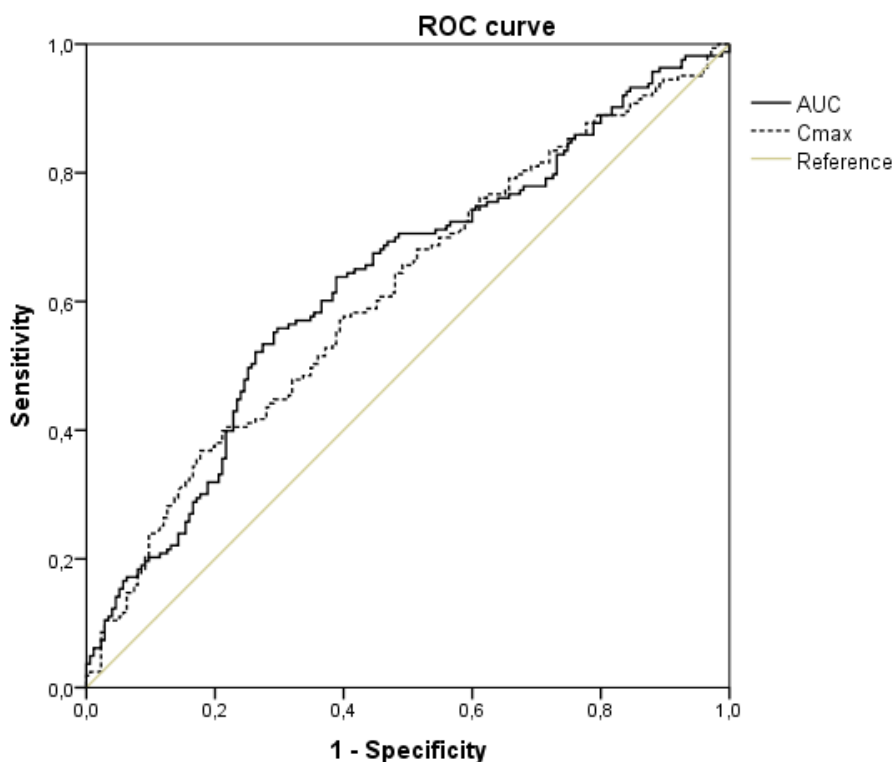
Tabla 35. Continuación.

| RAM                                | Hombres (N=89) | Mujeres (N=68) | p-valor      |
|------------------------------------|----------------|----------------|--------------|
|                                    | N (%)          | N (%)          | p-valor      |
| <b>Poliuria</b>                    | 1 (1,1%)       | 0 (0,0%)       | 1,000        |
| <b>Dificultad respiratoria</b>     | 0 (0,0%)       | 1 (1,5%)       | 0,433        |
| <b>Taquicardia</b>                 | 0 (0,0%)       | 1 (1,5%)       | 0,433        |
| <b>RAM según clasificación SOC</b> |                |                |              |
| <b>Neurológicas</b>                | 41 (46,1%)     | 39 (57,4%)     | 0,161        |
| <b>Gastrointestinales</b>          | 20 (22,5%)     | 30 (44,1%)     | <b>0,004</b> |
| <b>Cardiovasculares</b>            | 20 (22,5%)     | 17 (25,0%)     | 0,712        |
| <b>Generales</b>                   | 4 (4,5%)       | 8 (11,8%)      | 0,089        |
| <b>Psiquiátricas</b>               | 3 (3,4%)       | 6 (8,8%)       | 0,177        |
| <b>Genitourinarias</b>             | 1 (1,1%)       | 0 (0,0%)       | 0,567        |
| <b>Respiratorias</b>               | 0 (0,0%)       | 1 (1,5%)       | 0,433        |

#### 4.2 Influencia de la farmacocinética en las reacciones adversas

En nuestro estudio encontramos asociación entre los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol y el desarrollo de RAM. Los sujetos que sufrieron al menos una RAM presentaron mayores valores de AUC ( $1650,1 \pm 443,5$  versus  $1505,3 \pm 375,7$ ;  $P=0,008$ ) y de  $C_{\max}$  ( $50,9 \pm 12,8$  versus  $46,7 \pm 11,6$ ;  $P=0,002$ ) para aripiprazol en comparación con aquellos que no sufrieron RAM. Además, el desarrollo de náuseas/vómitos también estuvo ligado a mayores valores de  $C_{\max}$  ( $53,4 \pm 12,0$  versus  $48,0 \pm 12,4$ ;  $P=0,002$ ) y de AUC ( $1689,2 \pm 437,5$  versus  $1561,3 \pm 412,8$ ;  $P=0,096$ ), aunque en este último caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Pero si agrupamos por RAM gastrointestinales el desarrollo de las mismas estuvo relacionado tanto con mayores valores de  $C_{\max}$  ( $53,9 \pm 12,3$  versus  $47,8 \pm 12,2$ ;  $P=0,001$ ) como de AUC ( $1717,1 \pm 445,4$  versus  $1553,8 \pm 408,3$ ;  $P=0,027$ ).

Para establecer un punto de corte para averiguar a partir del AUC y la  $C_{\max}$  qué voluntarios tenían mayor riesgo de RAM se realizaron curvas ROC (figura 18). La curva ROC para el AUC y la  $C_{\max}$  fue mayor a 0,5 ( $P<0,001$  en ambos casos), para el AUC fue 0,631 (95% CI: 0,572 – 0,691) y para la  $C_{\max}$  0,613 (95%CI: 0,553 – 0,673). El mejor punto de corte para el AUC fue  $1570,3 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$  (sensibilidad del 55.8% y especificidad del 70.3%) y para la  $C_{\max}$  fue  $55,61 \text{ ng/mL}$  (sensibilidad del 36.8% y especificidad del 82.3%).



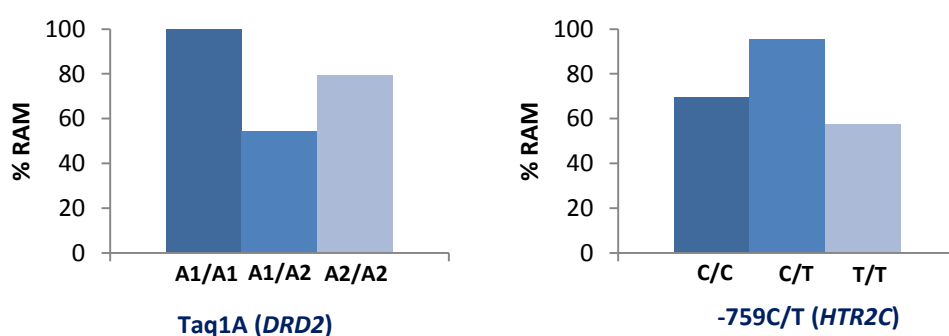
**Figura 18.** Curvas ROC para el AUC y la  $C_{max}$  para diferenciar sujetos con reacciones adversas.

Por otra parte, los niveles de dehidro-aripiprazol no se asociaron con el desarrollo de ninguna RAM. La suma de aripiprazol y de dehidro-aripiprazol al estar influenciada en mayor medida por los niveles de aripiprazol que del metabolito activo también se asoció con el desarrollo de cualquier RAM y de náuseas/vómitos pero al contar con un menor número de sujetos para esta variable ( $N=103$ ) consideramos para el modelo de regresión logística como variable principal los niveles de aripiprazol en vez de la suma total de sustancias activas.

Además, la farmacocinética de aripiprazol también se asoció con la tasa de abandono. Los voluntarios que abandonaron por vómitos después de la administración u otras RAM ( $N=11$ ) presentaron mayores valores de AUC ( $1759,3 \pm 658,5$  ng·h/mL versus  $1605,2 \pm 412,1$  ng·h/mL;  $P=0,988$ ) y de  $C_{max}$  de aripiprazol ( $56,4 \pm 17,4$  versus  $48,3 \pm 10,5$ ;  $P=0,068$ ) en comparación con aquellos sujetos que no lo abandonaron o que lo hicieron por motivos personales ( $N=146$ ), sin embargo, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

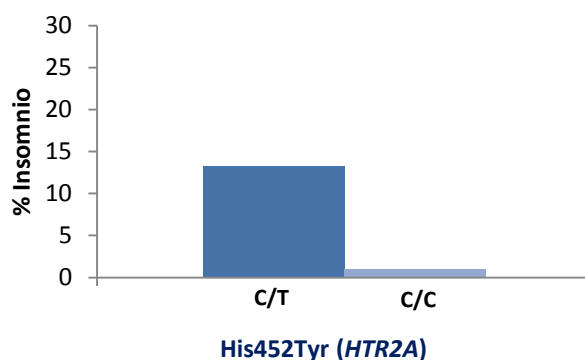
### 4.3 Influencia de los polimorfismos genéticos en las reacciones adversas

El desarrollo de ciertas RAM también se vio influenciado por diferentes polimorfismos genéticos. El desarrollo de al menos una RAM se asoció con el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* ( $P=0,006$ ) ya que en el 100% de los sujetos homocigotos mutados A1/A1 se produjo al menos una RAM mientras que en los sujetos A1/A2 y A2/A2 se produjeron en un 53,7% y 78,8%, respectivamente (figura 18). Asimismo, el polimorfismo -759C/T en el gen *HTR2C* también se asoció con el desarrollo de al menos una RAM ( $P=0,019$ ) siendo más frecuentes en los sujetos C/T (95,5%) seguidos de los C/C (69,4%) y por último T/T (57,1%) (figura 19).



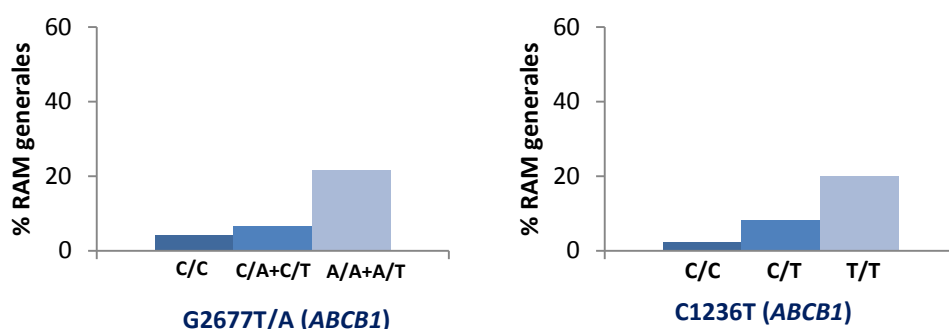
**Figura 19.** Frecuencia del desarrollo de cualquier RAM según los diferentes genotipos del polimorfismo Taq1A (gen *DRD2*) y -759C/T (gen *HTR2C*).

Las RAM psiquiátricas se asociaron con el polimorfismo His452Tyr del gen *HTR2A*, especialmente el insomnio ( $P=0,007$ ), siendo más frecuente en los sujetos C/T (13,3%) frente a los C/C (0,9%) (figura 20). Tras realizar un análisis de regresión logística se observó que los sujetos C/T presentaron un mayor riesgo de insomnio que los C/C, OR=17,385 (IC95%: 1,865-162,061) ( $P=0,012$ ).



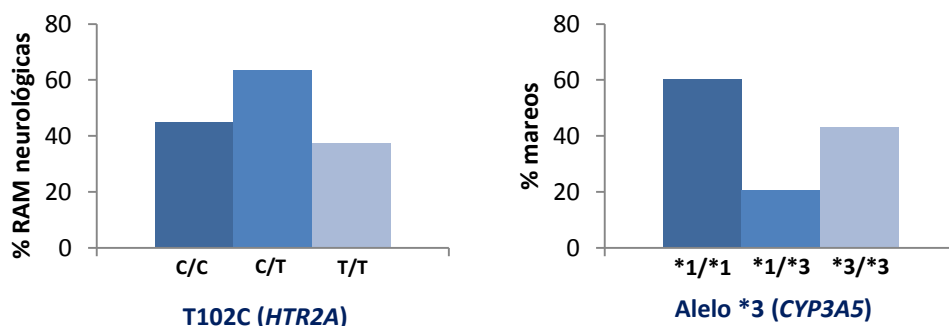
**Figura 20.** Frecuencia de RAM psiquiátricas según los diferentes genotipos del polimorfismo His452Tyr (gen *HTR2A*).

Como se aprecia en la figura 21, el desarrollo de las RAM de tipo general se asoció con dos polimorfismos del gen *ABCB1*: G2677T/A y C1236T ( $P=0,044$  y  $P=0,035$ , respectivamente). En el caso del polimorfismo G2677T/A fueron más frecuentes en la categoría de los sujetos homocigotos mutados (A/A + A/T, 21,7%) en comparación con los sujetos C/A y C/T (6,6%) y los homocigotos wild-type (4,1%). El 20% de los sujetos homocigotos mutados (T/T) para el C1236T desarrollaron estas RAM frente a un 8% de los C/T y un 2,1% de los C/C.



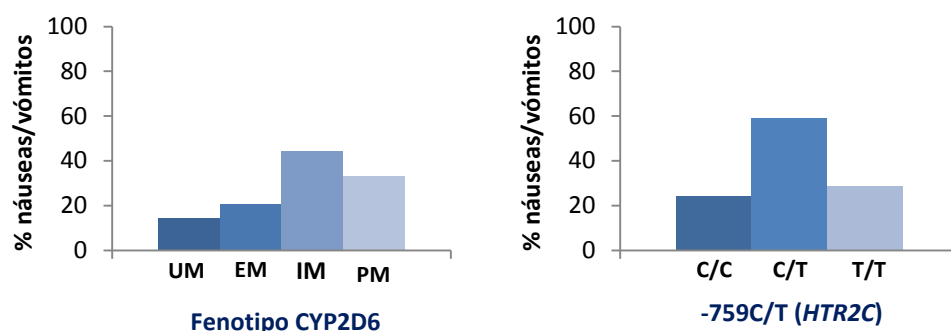
**Figura 21.** Frecuencia de RAM de tipo general según los diferentes genotipos del polimorfismo G2677T/A y C1236T, ambos en el gen *ABCB1*.

Las RAM neurológicas se asociaron con el polimorfismo T102C del gen *HTR2A*, siendo más frecuentes en los sujetos C/T (63,3%) en comparación con los C/C (44,9%) y T/T (37,1%) ( $P=0,029$ ) (figura 22). La incidencia de RAM neurológicas también se vio afectada por el genotipo del *CYP3A5* ( $P=0,017$ ), especialmente los mareos ( $P=0,028$ ), que fueron más frecuentes en los sujetos \*1/\*1 (60%) seguidos de los \*3/\*3 (43,1%) y \*1/\*3 (20,6%) (figura 22).



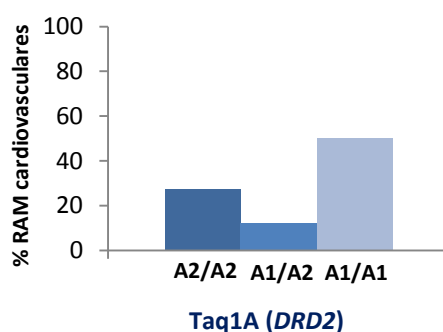
**Figura 22.** Frecuencia de RAM neurológicas según los diferentes genotipos del polimorfismo T102C (gen *HTR2A*) y frecuencia de mareos según los diferentes genotipos del *CYP3A5*.

La incidencia de RAM gastrointestinales se asoció con el fenotipo del *CYP2D6* ( $P=0,036$ ), el polimorfismo -759C/T del gen *HTR2C* ( $P=0,002$ ) y el polimorfismo Ser9Gly del gen *DRD3* ( $P=0,027$ ). Dentro de las RAM gastrointestinales, las náuseas/vómitos ( $P=0,014$ ) fueron mucho más frecuentes entre los sujetos con un menor grado de metabolismo, es decir, PM (33%) e IM (44,3%) vs EM (20,8%) y UM (14,3%) (figura 22). Esta RAM también se asoció con el polimorfismo -759C/T ( $P=0,005$ ), siendo más frecuentes en los sujetos C/T (59,1%) en comparación con T/T (28,6%) y C/C (24,1%) (figura 23). Esta RAM no alcanzó la significación estadística con el polimorfismo Ser9Gly ( $P=0,061$ ), a pesar de que en el grupo de RAM gastrointestinales sí que se encontraron diferencias significativas ya que el 41,8% de los sujetos heterocigotos sufrieron estas RAM frente al 23,9% de los sujetos Ser/Ser y al 10% de los Gly/Gly.



**Figura 23.** Frecuencia del desarrollo de náuseas/vómitos según los fenotipos del *CYP2D6* y los genotipos del polimorfismo -759C/T (gen *HTR2C*).

Por último la incidencia de RAM cardiovasculares se relacionó con el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* ( $P=0,049$ ), siendo más frecuentes en los sujetos A1/A1 (50,0%) frente a los A2/A2 (27,3%) y A1/A2 (12,2%) (figura 24).



**Figura 24.** Frecuencia del desarrollo de RAM cardiovasculares según los diferentes genotipos del polimorfismo Taq1A (gen *DRD2*).

El resto de RAM estudiadas no se asoció con ninguno de los polimorfismos analizados en el análisis bivalente.

#### 4.4 Modelo final de variables que afectan al desarrollo de RAM en el tratamiento con aripiprazol

Una vez realizado el análisis bivalente sobre las variables que influían en el desarrollo de RAM tales como variables farmacocinéticas (AUC y  $C_{\max}$ ), sexo y polimorfismos genéticos, realizamos un análisis de regresión logística binaria con el objetivo de poder construir un modelo predictivo del desarrollo de RAM durante el tratamiento con aripiprazol. En este apartado se recogen los factores que afectaron al desarrollo de RAM tras realizar este análisis multivariante.

El riesgo de sufrir al menos una RAM se asoció con el AUC de aripiprazol, el polimorfismo *CYP3A5*\*3, el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2*, el polimorfismo T102C del gen *HTR2A* y el polimorfismo -759C/T del gen *HTR2C* (tabla 36). A medida que aumentaba el AUC de aripiprazol aumentó el riesgo de RAM (OR=1,453 para incrementos de 0,1 unidades de Ln AUC de aripiprazol). Los genotipos \*1/\*1 del *CYP3A5*, A1/A1 del Taq1A, C/T del T102C y C/T del -759C/T representaron un factor de riesgo frente al desarrollo de RAM en el tratamiento con aripiprazol. Sin embargo, tras realizar este análisis el sexo no afectó al desarrollo de RAM.



**Tabla 36.** Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de al menos una RAM con aripiprazol.

| Variables independientes          |              | B      | ET(B)     | p            | OR                   | IC95% para OR |          |
|-----------------------------------|--------------|--------|-----------|--------------|----------------------|---------------|----------|
|                                   |              |        |           |              |                      | Inferior      | Superior |
| <b>Ln AUC<sub>0-t</sub> (ARI)</b> |              | 3,733  | 1,176     | <b>0,001</b> | 41,810               | 4,172         | 418,981  |
| <b>CYP3A5</b>                     | <b>*3/*3</b> | ---    | ---       | <b>0,013</b> | ---                  | ---           | ---      |
|                                   | <b>*1/*1</b> | 20,641 | 15260,080 | 0,999        | 9,21X10 <sup>8</sup> | 0,000         | ---      |
|                                   | <b>*1/*3</b> | -1,636 | 0,554     | <b>0,003</b> | 0,195                | 0,066         | 0,576    |
| <b>Taq1A (DRD2)</b>               | <b>A2/A2</b> | ---    | ---       | <b>0,003</b> | ---                  | ---           | ---      |
|                                   | <b>A1/A1</b> | 19,031 | 17633,676 | 0,999        | 1,84X10 <sup>8</sup> | 0,000         | ---      |
|                                   | <b>A1/A2</b> | -1,774 | 0,514     | <b>0,001</b> | 0,170                | 0,062         | 0,465    |
| <b>T102C (HTR2A)</b>              | <b>T/T</b>   | ---    | ---       | <b>0,037</b> | ---                  | ---           | ---      |
|                                   | <b>C/C</b>   | 1,011  | 0,572     | 0,077        | 2,749                | 0,895         | 8,441    |
|                                   | <b>C/T</b>   | 1,558  | 0,613     | <b>0,011</b> | 4,749                | 1,429         | 15,784   |
| <b>-759C/T (HTR2C)</b>            | <b>C/C</b>   | ---    | ---       | <b>0,030</b> | ---                  | ---           | ---      |
|                                   | <b>C/T</b>   | 3,068  | 1,194     | <b>0,010</b> | 21,494               | 2,072         | 223,008  |
|                                   | <b>T/T</b>   | -0,295 | 0,715     | 0,680        | 0,744                | 0,183         | 3,023    |
| <b>Constante</b>                  |              | 1,844  | 0,472     | <b>0,000</b> | 6,322                | ---           | ---      |

**Categorías de referencia:** \*3/\*3 (CYP3A5), A2/A2 (Taq1A), T/T (T102C) y C/C (-759C/T).

Como se aprecia en la tabla 37, el riesgo de náuseas/vómitos fue mayor en las mujeres que en los hombres. Además, el riesgo de sufrir esta RAM aumentó a medida que aumentaba el AUC de aripiprazol (OR= 1,289 por cada incremento de 0,1 unidades en el Ln AUC de aripiprazol). Las náuseas/vómitos no se relacionaron con ningún polimorfismo tras el análisis multivariante.

**Tabla 37.** Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de náuseas/vómitos con aripiprazol.

| Variables independientes         | B      | ET(B) | p            | OR     | IC95% para OR |          |
|----------------------------------|--------|-------|--------------|--------|---------------|----------|
|                                  |        |       |              |        | Inferior      | Superior |
| <b>Sexo</b>                      | 0,829  | 0,383 | <b>0,030</b> | 2,290  | 1,082         | 4,850    |
| <b>LnAUC<sub>0-t</sub> (ARI)</b> | 2,540  | 0,848 | <b>0,003</b> | 12,685 | 2,406         | 66,892   |
| <b>Constante</b>                 | -1,370 | 0,279 | <b>0,000</b> | 0,254  | ---           | ---      |

**Categoría de referencia para el sexo:** hombres.

El desarrollo de mareos se relacionó con el sexo y con el polimorfismo *CYP3A5*\*3 (tabla 38). El riesgo de mareo fue mayor en las mujeres y en los sujetos \*3/\*3 comparado con los sujetos \*1/\*3.

**Tabla 38.** Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de mareos con aripiprazol.

| Variables independientes |              | B      | ET(B) | p            | OR    | IC95% para OR |          |
|--------------------------|--------------|--------|-------|--------------|-------|---------------|----------|
|                          |              |        |       |              |       | Inferior      | Superior |
| <b>Sexo</b>              |              | 0,769  | 0,363 | <b>0,034</b> | 2,158 | 1,059         | 4,398    |
| <b>CYP3A5</b>            | <b>*3/*3</b> | ---    | ---   | <b>0,021</b> | ---   | ---           | ---      |
|                          | <b>*1/*1</b> | 0,688  | 0,949 | 0,469        | 1,989 | 0,310         | 12,765   |
|                          | <b>*1/*3</b> | -1,271 | 0,484 | <b>0,009</b> | 0,281 | 0,109         | 0,725    |
| <b>Constante</b>         |              | -0,574 | 0,243 | <b>0,018</b> | 0,563 | ---           | ---      |

Categoría de referencia para el sexo: hombres.

En el desarrollo de RAM gastrointestinales (compuestas por náuseas/vómitos, dolor abdominal y gastroenteritis) estuvieron implicados el AUC de aripiprazol así como el polimorfismo -759C/T (gen *HTR2C*). Por cada incremento de 0,1 unidades de Ln AUC de aripiprazol el OR fue de 1,291 (IC95%: 1,090 - 1,530). El genotipo C/T del polimorfismo constituyó un factor de riesgo frente a estas RAM (tabla 39).

**Tabla 39.** Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de RAM gastrointestinales con aripiprazol.

| Variables independientes          |            | B      | ET(B) | p            | OR     | IC95% para OR |          |
|-----------------------------------|------------|--------|-------|--------------|--------|---------------|----------|
|                                   |            |        |       |              |        | Inferior      | Superior |
| <b>Ln AUC<sub>0-t</sub> (ARI)</b> |            | 2,557  | 0,866 | <b>0,003</b> | 12,892 | 2,362         | 70,371   |
| <b>-759C/T (HTR2C)</b>            | <b>C/C</b> |        |       | <b>0,015</b> |        |               |          |
|                                   | <b>C/T</b> | 1,495  | 0,517 | <b>0,004</b> | 4,457  | 1,619         | 12,269   |
|                                   | <b>T/T</b> | 0,295  | 0,652 | 0,651        | 1,343  | 0,375         | 4,815    |
| <b>Constante</b>                  |            | -1,211 | 0,239 | <b>0,000</b> | 0,298  |               |          |

Categoría de referencia para el polimorfismo -759C/T: C/C.

En el desarrollo de RAM neurológicas (que engloban mareo, cefalea, somnolencia e hipo) influyeron el AUC de aripiprazol y los polimorfismos *CYP3A5*\*3, Taq1A (gen *DRD2*) y T102C (gen *HTR2A*) (tabla 40). Los sujetos \*1/\*1 para el *CYP3A5*, A2/A2 para el Taq1A y C/T para el T102C presentaron mayores porcentajes de estas RAM en

comparación con el genotipo de referencia. Además, estas RAM aumentaron a medida que aumentaba el  $AUC_{0-t}$  del sujeto ( $OR=1,209$  por cada 0,1 unidades de aumento en  $\ln AUC_{0-t}$ ).

**Tabla 40.** Resultados del análisis de regresión logística donde se muestran las variables que afectan al desarrollo de RAM neurológicas con aripiprazol.

| Variables independientes                |              | B      | ET(B) | p            | OR    | IC95% para OR |          |
|---|--------------|--------|-------|--------------|-------|---------------|----------|
|   |              |        |       |              |       | Inferior      | Superior |
| <b><math>\ln AUC_{0-t}</math> (ARI)</b> |              | 1,901  | 0,817 | <b>0,020</b> | 6,690 | 1,348         | 33,209   |
| <b>CYP3A5</b>                           | <b>*3/*3</b> | ---    | ---   | <b>0,048</b> | ---   | ---           | ---      |
|   | <b>*1/*1</b> | 1,207  | 1,262 | 0,339        | 3,345 | 0,282         | 39,645   |
|   | <b>*1/*3</b> | -0,984 | 0,450 | <b>0,029</b> | 0,374 | 0,155         | 0,904    |
| <b>Taq1A (DRD2)</b>                     | <b>A2/A2</b> | ---    | ---   | <b>0,035</b> | ---   | ---           | ---      |
|   | <b>A1/A1</b> | -2,095 | 1,257 | 0,096        | 0,123 | 0,010         | 1,446    |
|   | <b>A1/A2</b> | -0,891 | 0,412 | <b>0,031</b> | 0,410 | 0,183         | 0,920    |
| <b>T102C (HTR2A)</b>                    | <b>T/T</b>   | ---    | ---   | <b>0,014</b> | ---   | ---           | ---      |
|   | <b>C/C</b>   | 0,930  | 0,429 | <b>0,030</b> | 2,535 | 1,094         | 5,876    |
|   | <b>C/T</b>   | -0,376 | 0,478 | 0,431        | 0,686 | 0,269         | 1,751    |
| <b>Constante</b>                        |              | 0,200  | 0,338 | 0,554        | 1,221 | ---           | ---      |

Categorías de referencia: \*3/\*3 (CYP3A5), A2/A2 (Taq1A) y T/T (T102C).

## V. DISCUSIÓN

---



## 1. POBLACIÓN ESTUDIADA

### 1.1 Comparación de las frecuencias alélicas frente a otras poblaciones caucásicas

#### ❖ *CYP2D6*

Como se ha descrito en la sección de Resultados, en nuestro estudio encontramos algunas diferencias entre las frecuencias alélicas encontradas en nuestra población con las previamente reportadas en población caucásica.

La menor frecuencia del alelo \*4 del *CYP2D6* en nuestra población con respecto a la caucásica puede deberse a que este alelo es menos frecuente en población española tal y como ha sido descrito en otros estudios como el realizado por Menoyo (Menoyo et al. 2006) en el que se analizó a 105 voluntarios sanos españoles en el que la frecuencia de este alelo fue aún más baja (13,8%) que en nuestro estudio. No es extraño que en nuestro estudio no encontrásemos sujetos portadores del alelo \*7 ya que se trata de una variante rara en población caucásica, siendo su frecuencia del 0,08% en algunos estudios (Sachse et al. 1997) mientras que en otros no se ha descrito (Menoyo et al. 2006). Además, tampoco encontramos sujetos portadores de duplicaciones del alelo inactivo \*4 ya que es una variante de baja frecuencia en población caucásica (0,47%) (Menoyo et al. 2006).

Por otra parte, llama la atención la baja frecuencia de PM en nuestra población (2%) frente a lo descrito previamente en población caucásica (8-10%) (Sachse et al. 1997). A pesar de que en población española la frecuencia de PM es inferior a la caucásica (aproximadamente un 5%) las diferencias encontradas en nuestra población son muy grandes. Estas diferencias no pueden deberse a limitaciones metodológicas ya que hemos medido los alelos nulos más frecuentes en población caucásica tales como el \*3, \*4, \*5, \*6 y \*7. De hecho se estima que con el genotipado únicamente de los alelos \*3, \*4 y \*5 se puede predecir el 99% de los sujetos PM caucásicos (Dahl et al. 1992).

La frecuencia de IMs en nuestra población fue mayor a lo descrito anteriormente en población española (Llerena et al. 2007). Sorprende la mayor frecuencia puesto que en nuestro estudio no analizamos algunos polimorfismos de actividad reducida típicos de población caucásica tales como el \*10, \*17 y \*41 (Llerena et al. 2014).

En cuanto a la frecuencia de UM encontrada en nuestra población, a pesar de que no encontramos diferencias significativas con las del estudio realizado en 142 voluntarios sanos españoles por el grupo de Llerena (Llerena et al. 2007) que fue del 6,3%, sí que observamos que la frecuencia de UM en nuestra población (4,7%) fue menor a la que había sido descrita previamente en población caucásica, especialmente en la región Mediterránea (en torno a un 7-10%) (Agúndez et al. 1995; Bernal et al. 1999; Scordo et al. 2004). Estas altas frecuencias de UM descritas en los países mediterráneos tales como España, Italia, Portugal y Grecia se han relacionado con la conquista árabe en el Mediterráneo dado que en la población árabe el porcentaje de sujetos UM es bastante superior a la media, variando de un 11% en la población de Oriente Medio (Llerena et al. 2014) a un 28,7% en población etíope (Aklillu et al. 1996). Estas discrepancias se pueden deber a que hasta la fecha los estudios realizados tenían ciertas limitaciones metodológicas ya que consideraban como UM a cualquier sujeto portador de una duplicación independientemente de la actividad del alelo duplicado y en muchos casos se analizaba un número insuficiente de alelos nulos o parcialmente nulos (Naranjo et al. 2016). En estudios realizados recientemente y sin estas limitaciones metodológicas las frecuencias de UM descritas en poblaciones del Sur del Mediterráneo como España (Naranjo et al. 2016) y Portugal (Correia et al. 2009) fueron inferiores (5,34% y 4,7%, respectivamente) a lo descrito previamente, igual que ocurrió en nuestra población.

#### ❖ **CYP3A4**

No encontramos diferencias en las frecuencias descritas para el alelo \*20 del gen *CYP3A4*, sin embargo la frecuencia del alelo \*22 en nuestra población (2%) fue inferior a lo previamente descrito en población caucásica (5,3%) (Elens et al. 2013). Esto se debe a que la frecuencia de este alelo es ligeramente inferior en poblaciones mediterráneas tales como la española o la italiana (aproximadamente del 3,7% en ambas) en comparación a la media caucásica (4,5%) (Base de datos del Proyecto 1000 genomas; <http://www.internationalgenome.org>).

#### ❖ **CYP3A5**

En nuestro estudio la frecuencia del alelo inactivo \*3 fue del 85,1%, menor a lo descrito tanto en población caucásica como en española (91,0%) (Gervasini et al. 2005). Estas diferencias observadas, no se pueden justificar por el tamaño muestral ya

que en el estudio de Gervasini (Gervasini et al. 2005) se analizaron un número de sujetos muy similar al de nuestra población, 177 sujetos, aunque fueron pacientes y no voluntarios sanos.

❖ **ABCB1**

Las frecuencias halladas en nuestra población para alelo T del polimorfismo C1236T y para los alelos A y T del polimorfismo G2677T/A fueron similares a las descritas previamente en población caucásica y española. El alelo T del polimorfismo C3435T fue menos prevalente en nuestra población (48,6%) si lo comparamos con la población caucásica del Proyecto 1000 genomas (56,6%), sin embargo, se ha descrito una menor frecuencia de este alelo en estudios realizados en población española (48,4%) (Bernal et al. 2003) y en la población ibérica recogida en el Proyecto 1000 genomas (46,3%), que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

❖ **DRD2**

La frecuencia del alelo minoritario A1 del polimorfismo Taq1A en nuestra población fue similar a la encontrada en población caucásica y española.

Sin embargo, la frecuencia del alelo T del polimorfismo C957T fue superior en nuestra población (59%) en comparación con la población caucásica del Proyecto 1000 genomas (50%). La frecuencia de esta variante es ligeramente superior en población española tal y como se describe en el Proyecto de 1000 genomas (57,9%) y en otros estudios realizados en población española, en el que su frecuencia fue del 59,2% (Huertas et al. 2012).

❖ **DRD3**

La frecuencia hallada en nuestra población para el alelo Gly del polimorfismo Ser9Gly (30,2%) fue similar a la descrita tanto en la población caucásica del Proyecto de 1000 genomas (34,3%) y en población caucásica nórdica (32%) (Güzey et al. 2011) como en la población española del Proyecto de 1000 genomas (29%).

❖ **HTR2A**

No encontramos diferencias en las frecuencias descritas para los polimorfismos T102C e His452Tyr. Para el alelo T del polimorfismo T102C la frecuencia hallada en nuestra



población (45,1%) fue similar a la descrita en población caucásica (45,5%), en la población española del Proyecto de 1000 genomas (47,2%) y en una población española de 211 voluntarios sanos (45%) (López-Rodríguez et al. 2013). En nuestra población la frecuencia del alelo T del polimorfismo His452Tyr fue del 10,4%, lo que está en sintonía con lo descrito en las poblaciones caucásicas y españolas del Proyecto de 1000 genomas (7,6 y 10,7%, respectivamente) y con una población española de 211 voluntarios sanos (11%) (López-Rodríguez et al. 2013).

#### ❖ **HTR2C**

No encontramos diferencias en las frecuencias descritas para el alelo T del polimorfismo -759C/T, siendo la frecuencia en nuestra población del 17,4% frente al 16,8% y 15,6% descrito en población caucásica y española del Proyecto de 1000 genomas, respectivamente.

### **1.2 Diferencias en las frecuencias genotípicas frente al sexo**

En nuestra población las frecuencias genotípicas no difirieron entre sexos excepto para el polimorfismo His452Tyr (gen *HTR2A*) y el -759C/T (gen *HTR2C*).

En un estudio realizado en pacientes brasileños con ascendencia europea con déficit de atención (Guimarães et al. 2007) se observó que el alelo C del polimorfismo His452Tyr era más frecuente en el sexo masculino (83,6%), datos que son similares a los obtenidos en nuestro estudio (86,9%). Estas diferencias entre sexos podrían deberse a que existe dimorfismo sexual en los niveles de ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> y en la densidad de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Zhang et al. 1999)

En el caso del polimorfismo -759C/T del gen *HTR2C* al encontrarse este gen en el cromosoma X es de esperar que se encuentren diferencias en la distribución entre sexos. Los hombres al presentar un único cromosoma X sólo tendrán dos genotipos posibles: C o T, mientras que las mujeres al tener dos cromosomas X tendrán tres genotipos posibles: C/C, C/T y T/T. No obstante, debemos tener en cuenta que también se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas.

Con el fin de controlar el efecto que la diferente distribución de las frecuencias genotípicas pudiera ejercer sobre los parámetros farmacodinámicos o de seguridad se realizaron análisis multivariantes a posteriori.

## 2. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

### 2.1 Datos de biodisponibilidad y bioequivalencia y análisis farmacocinético

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en nuestro estudio para aripiprazol y su metabolito activo fueron similares a los descritos en la literatura realizados en voluntarios sanos (Azuma et al. 2012; Jeon et al. 2016; Kubo et al. 2007). Asimismo, se demostró bioequivalencia en los seis estudios y entre los comprimidos y comprimidos bucodispersables lo que justifica que durante todo el estudio no se haga distinción entre la forma farmacéutica y los datos se usen conjuntamente.

### 2.2 Influencia del sexo en la farmacocinética

La influencia del sexo en la farmacocinética es un aspecto que ha sido bastante estudiado hasta la fecha. Existen diferentes factores que podrían causar estas diferencias entre sexos tales como los cambios hormonales o las diferencias en la composición corporal (Marazziti et al. 2013; Schwartz et al. 2003). Las mujeres suelen presentar mayores valores de  $V_d/F$  debido a su mayor porcentaje de grasa corporal (Schwartz et al. 2003). Se ha observado que, en general, las mujeres tienen mayores concentraciones plasmáticas de los fármacos debido a que presentan una menor secreción de ácido y motilidad gástrica así como un menor grado de metabolismo y menor eliminación renal (Hutson et al. 1989; Kashuba et al. 1998), el menor peso en el sexo femenino también va a ser un condicionante.

En nuestro estudio el  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$  y  $V_d/F$  fueron mayores en las mujeres en comparación con los hombres. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la ficha técnica de la FDA (Ficha técnica Abilify®, FDA) que recoge la siguiente información “la  $C_{max}$  y el AUC de aripiprazol fueron de un 30% a un 40% mayores en mujeres que en hombres. Sin embargo, estas diferencias se explican por las diferencias en el peso corporal (25%) entre hombres y mujeres”. No obstante, las diferencias encontradas en este estudio fueron pequeñas (14% y 10% para la  $C_{max}$  y  $AUC_{0-t}$  sin ajustar y aproximadamente un -7% para ambos parámetros ajustados por dosis/peso). Además, después de ajustar por dosis/peso la  $C_{max}$  y  $AUC_{0-t}$  fueron mayores en hombres, a pesar de que no hubo diferencias en el  $CL/F$ . Como no encontramos diferencias en el  $CL/F$  ni en el ratio dehidro-aripiprazol/aripiprazol el hecho de que la  $C_{max}$  y  $AUC_{0-t}$  ajustadas por dosis/peso sean menores en las mujeres que en los hombres podría estar causado por el

mayor  $V_d/F$  en mujeres. No obstante, las diferencias entre sexos fueron pequeñas, como se ha descrito previamente, y menos relevantes que las diferencias causadas por determinados polimorfismos genéticos, como veremos más adelante, por lo que no justifican el ajuste de dosis de aripiprazol en base al sexo.

Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos en otro estudio (Aichhorn et al. 2006) en el que se analizó la relación entre el sexo y las concentraciones plasmáticas de diferentes antipsicóticos y sólo se encontró asociación en el caso de la clozapina y olanzapina pero no con aripiprazol. Además, otros estudios tampoco encontraron un efecto del sexo en las concentraciones plasmáticas de aripiprazol (Molden et al. 2006; Bachmann et al. 2008). Estos resultados contradictorios podrían explicarse por diferencias en el diseño del estudio tales como que estos ensayos fueron de dosis múltiple mientras que el nuestro fue de dosis única. No obstante, en dosis múltiple las diferencias deberían ser mayores que en dosis única.

## 2.3 Influencia de los polimorfismos genéticos en la farmacocinética

### 2.3.1 Influencia del *CYP2D6* en la farmacocinética de aripiprazol

Nuestro estudio confirma la influencia de los polimorfismos en el gen *CYP2D6* sobre la farmacocinética de aripiprazol, como previamente se había descrito por otros autores (Hendset et al. 2007; Suzuki et al. 2014; van der Weide et al. 2015; Jeon et al. 2016). Actualmente, las agencias reguladoras tales como la FDA o la EMA están incluyendo información farmacogenética en la ficha técnica. De hecho, según la ficha técnica de la FDA (Ficha técnica Abilify®, FDA) los PMs presentan unas concentraciones de aripiprazol un 80% mayores en comparación con los EMs y una disminución del 30% en las concentraciones del metabolito activo lo que resulta en una exposición un 60% mayor al total de sustancias activas en comparación con los EMs. En nuestro estudio, los PM presentaron un  $AUC_{0-t}$  de aripiprazol un 50% mayor en comparación con los EM mientras que el  $AUC_{0-t}$  del metabolito activo fue un 33% menor, dando lugar a una exposición total de un 31% mayor en comparación con los EMs. Estos resultados concuerdan con los del grupo de Hendset (Hendset et al. 2007).

En base a estos resultados estamos de acuerdo en sugerir una reducción de dosis aproximadamente del 50% en los sujetos PM tal y como recomienda la FDA (Ficha

técnica Abilify®, FDA). A pesar de estas evidencias, el genotipado del *CYP2D6* no está implementado en la práctica clínica por lo que consideramos que este estudio puede aportar un granito de arena en el apoyo a la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica habitual y puede concienciar y educar a los clínicos en la importancia de genotipar a los pacientes para poder realizar ajustes de dosis que puedan prevenir y/o minimizar las reacciones adversas y fallos terapéuticos, no sólo en los fármacos antipsicóticos si no en el gran número de fármacos que son metabolizados por esta ruta.

### 2.3.2 [Influencia del \*CYP3A4\* en la farmacocinética de aripiprazol](#)

En nuestro estudio el polimorfismo *CYP3A4*\*22 no influyó sobre ninguno de los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol ni de su metabolito activo. Esta falta de influencia ya había sido descrita en estudios realizados en pacientes (van der Weide et al. 2015; Rafaniello et al. 2017). Además, sólo identificamos a un sujeto portador del polimorfismo *CYP3A4*\*20 en heterocigosis, por lo que, a pesar de que había cierta tendencia a un grado menor de metabolismo en dicho sujeto, no se pudo hacer una correcta evaluación del mismo con un solo sujeto. Parecer ser que, aunque, la enzima *CYP3A4* tiene un papel importante en el metabolismo de aripiprazol y su metabolito (Kubo et al. 2005), las variantes genéticas identificadas hasta la fecha como *CYP3A4*\*22 no son capaces de predecir o justificar la variabilidad en la respuesta a aripiprazol.

### 2.3.3 [Influencia del \*CYP3A5\* en la farmacocinética de aripiprazol](#)

Hasta ahora, se sabe muy poco del efecto del polimorfismo *CYP3A5*\*3 sobre el metabolismo de aripiprazol. Los estudios llevados a cabo no han encontrado asociación entre esta variante y la farmacocinética de aripiprazol (Jeon et al. 2016; Kim et al. 2008a). Nuestros resultados mostraron que esta variante influye en el ratio dehidro-aripiprazol/aripiprazol ya que los sujetos \*3/\*3 tienen un menor metabolismo lo que sería congruente con la información previa (Lamba et al. 2012). Sin embargo, la influencia del *CYP3A5* sería mínima comparada con la que ejerce el *CYP2D6* en la farmacocinética de aripiprazol ya que si comparamos el valor del ratio de los sujetos \*3/\*3 se encontraría en un punto intermedio entre los sujetos IM y EM para el *CYP2D6*.

No obstante, debemos tener en cuenta que el sujeto portador del alelo \*20 tiene un aclaramiento un 37% inferior al de los sujetos wild-type (en los IM para CYP2D6 solo se reduce un 24% con respecto a EM), por lo que sería necesario realizar un estudio con un mayor número de sujetos portadores de este alelo para evaluar la relevancia clínica. Es muy probable que puede tener consecuencias importantes en los sujetos homocigotos mutados (\*22/\*22), por muy raro que este genotipo pueda ser.

#### 2.3.4 Influencia del *ABCB1* en la farmacocinética de aripiprazol

Nuestro estudio mostró por primera vez la influencia de la variante C1236T en el gen *ABCB1* sobre la farmacocinética de aripiprazol. Los sujetos T/T presentaron un menor aclaramiento lo que podría estar relacionado con una menor actividad de la glicoproteína-P en estos sujetos (Moons et al. 2011). El efecto de esta variante sobre el aclaramiento de varios fármacos, principalmente quimioterápicos como docetaxel (Bosch et al. 2006) e irinotecan (Mathijssen et al. 2003) ya había sido descrito, sin embargo, no se había evaluado hasta la fecha su papel sobre aripiprazol. Además, los sujetos T/T también mostraron menor  $AUC_{0-t}$  y  $C_{max}$  de dehidro-aripiprazol, hecho que puede estar causado por un efecto inductor de la glicoproteína-P sobre los citocromos responsables de la transformación de aripiprazol a dehidro-aripiprazol (principalmente el CYP3A4). Como se había descrito previamente (Lamba et al. 2006) los sujetos T/T para el polimorfismo G2677T/A presentan una disminución en la inducción del CYP3A4 por rifampicina. En nuestro estudio, los bajos niveles de dehidro-aripiprazol encontrados entre los sujetos T/T para el C1236T podrían explicarse por una posible disminución en la inducción del CYP3A4. La mayor influencia de este SNP en los niveles del metabolito que en los de aripiprazol se puede deber a una mayor afinidad del metabolito por la glicoproteína-P (Kirschbaum et al. 2010).

Tras realizar el análisis multivariante no encontramos efecto de las otras dos variantes estudiadas (C3435T y G2677T/A) con ninguno de los parámetros farmacocinéticos analizados, lo que está en sintonía con lo descrito previamente en un estudio llevado a cabo en pacientes japoneses de edad adulta (Suzuki et al. 2014). Sin embargo y de manera contraria a la tendencia encontrada en nuestro estudio, el estudio llevado a cabo por el equipo de Rafaniello en pacientes pediátricos caucásicos sí que encontró efecto de ambos polimorfismos sobre la farmacocinética ya que los sujetos con el

genotipo 2677TT/3435TT presentaron concentraciones más bajas de aripiprazol (Rafaniello et al. 2017). Hasta la fecha los resultados arrojados a partir de los estudios que han analizado el papel de estos polimorfismos sobre la farmacocinética de diferentes fármacos han sido bastante contradictorios (Leschziner et al. 2007; Wolking et al. 2015). Recientemente, nuestro grupo publicó un estudio sobre el efecto del SNP C3435T en la farmacocinética de 4 antipsicóticos (olanzapina, quetiapina, risperidona y aripiprazol) y 4 antidepressivos (trazodona, sertralina, agomelatina y citalopram) (Saiz-Rodríguez et al. 2018), concluyendo que este polimorfismo puede afectar a la eliminación de los fármacos en diferente manera y magnitud. Se observó una mayor eliminación en el caso de risperidona, trazodona y dehidro-aripiprazol mientras que en el caso de olanzapina y citalopram estuvo reducida. Para el resto de fármacos, incluidos el aripiprazol, no se observó un efecto significativo. A la luz de estos resultados, consideramos que es necesario realizar más estudios antes de poder realizar recomendaciones de dosis basándonos en los polimorfismos del gen *ABCB1*.

### 3. ANÁLISIS FARMACODINÁMICO

#### 3.1 Análisis de la tensión arterial y parámetros electrocardiográficos (QTc y FC)

En nuestro estudio el aripiprazol aumentó la FC y disminuyó la TAS y TAD. Estos resultados concuerdan con lo descrito en otros estudios en los cuales se describió un aumento medio de la FC con respecto al basal de 4 lpm en el caso de aripiprazol en comparación con 1 lpm en los sujetos que recibieron placebo. Este efecto se puede deber a una respuesta compensatoria a la disminución de la tensión arterial (FDA, Drug Approval Package, Abilify®). La hipotensión ortostática es un efecto adverso común en muchos fármacos antipsicóticos y tal como se muestra en nuestro estudio, el aripiprazol tuvo un efecto hipotensor, sin embargo, también se han descrito algunos casos de hipertensión durante el tratamiento con este medicamento (Borras et al. 2005; Yasui-Furukori et al. 2013). El efecto hipotensor del aripiprazol estaría producido por su antagonismo sobre los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

La prolongación del intervalo QTc es un factor de riesgo de muerte súbita, estando entre los factores causantes el uso de fármacos tales como los antipsicóticos. El efecto que ejerce este grupo de medicamentos en la prolongación del QTc es de sobra conocido y ha sido ampliamente descrito (Haddad et al. 2002; van Noord et al. 2010),

encontrándose entre los que más frecuentemente la producen la tioridazina (cuya autorización de comercialización se suspendió en España en el año 2005) y la ziprasidona (Stöllberger et al. 2005).

Hasta ahora el efecto de aripiprazol sobre el intervalo QTc sigue sin ser del todo claro. La mayoría de los estudios publicados muestran un efecto nulo o reductor, tales como el realizado por Pigott y cols (Pigott et al. 2003) en el que se produjo una disminución de 6,94 ms de dicho intervalo en pacientes psiquiátricos al final del tratamiento en comparación con el basal. Este efecto ha sido descrito también en varias revisiones y meta-análisis posteriores (Leucht et al. 2013; Jensen et al. 2015). Sin embargo, en la literatura existen estudios que describen justamente lo contrario, como el llevado a cabo por el equipo de Iribarren, en el que se analizaron más de 90 fármacos en 59,467 pacientes (Iribarren et al. 2013) y donde el aripiprazol produjo de media una prolongación del QTc de 7,6 ms. En nuestro estudio la prolongación del QTc fue aproximadamente de 9 ms lo que está en sintonía con lo citado anteriormente.

Además, se han descrito diferentes casos de incrementos en el QTc de manera dosis-dependiente en pacientes sin historia previa de riesgo cardiovascular (Suzuki et al. 2011b) e incluso Nelson y Leung describieron un caso de “Torsades de pointes” en un paciente sin historia previa de riesgo cardiovascular después de la administración de una dosis muy baja de aripiprazol (2,5 mg) (Nelson et al. 2013).

Este es el primer estudio en demostrar una relación entre el AUC de aripiprazol y cambios en la TAS, TAD y FC. Sorprendentemente, los niveles de aripiprazol no se relacionaron con la prolongación del QTc. De la misma manera, los niveles del metabolito activo no estuvieron relacionados con ninguno de estos parámetros farmacodinámicos. Posiblemente estos hallazgos negativos se deban a que se trata de un estudio en dosis única y además, el metabolito tarda varios días en acumularse.

### 3.1.1 Influencia del sexo en la farmacodinamia

Las diferencias con respecto al sexo en la tensión arterial y en los parámetros electrocardiográficos tales como la FC y el QTc son bastante conocidos en la actualidad (Heffernan et al. 2007; Maranon et al. 2013; Olsen et al. 2013; Darpo et al. 2014). Los mayores valores de QTc en las mujeres pueden estar debidos a factores genéticos u

hormonales (Rabkin et al. 2015). En un estudio realizado en pacientes psiquiátricos con 4 antipsicóticos entre los que se incluía el aripiprazol, sólo se encontraron diferencias en el intervalo QTc con respecto al sexo en el caso de olanzapina (Suzuki et al. 2013). Mientras que en otro estudio realizado tanto en pacientes como en voluntarios sanos (Fujii et al. 2014), se observó un efecto del sexo en el QTc en los voluntarios sanos pero no en el caso de los pacientes. Estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestra población, en la que las mujeres tuvieron mayores valores del QTc que los hombres pero el efecto del fármaco sobre el QTc fue similar en ambos sexos.

Por otra parte, es frecuente que las mujeres presenten valores más bajos de tensión arterial ya que tienen un menor tono autonómico de control de la tensión arterial basal y respuestas vasoconstrictoras menos pronunciadas a la estimulación adrenérgica lo que puede estar relacionado con un efecto vasodilatador de los estrógenos (Hart et al. 2009). Las diferencias observadas en la FC están causadas por las diferencias que existen entre sexos en el control autonómico de la actividad cardiovascular, en general las mujeres muestran una mayor modulación parasimpática mientras que los hombres se produce un dominio simpático (Koenig et al. 2016).

### 3.1.2 Influencia de los polimorfismos genéticos en la farmacodinamia

Debido a que las asociaciones encontradas en los valores post-tratamiento del QTc y la TAD con diferentes polimorfismos tales como el C957T, His452Tyr y T102C fueron de pequeña envergadura y además, no se encontraron diferencias cuando se analizó el aumento del QTc y la disminución de la TAD con respecto a los valores basales, se consideró que estas asociaciones encontradas no son de relevancia clínica.

En este apartado únicamente encontramos un efecto del polimorfismo Taq1A (gen *DRD2*) sobre el aumento del QTc en el tratamiento con aripiprazol, representando el genotipo A1/A1 el grupo con mayor predisposición al aumento del QTc. Como ya se ha descrito anteriormente, los sujetos portadores de este alelo minoritario se caracterizan por presentar una menor densidad de receptores de dopamina lo cual justifica esta diferencia en la respuesta farmacodinámica (Suzuki et al. 2000). Hasta la fecha no existen estudios que evalúen el efecto de esta variante sobre parámetros electrocardiográficos tales como el QTc, que podrían ser relevantes en la seguridad del tratamiento con antipsicóticos.



Tras realizar el análisis de regresión lineal múltiple, cabe destacar la influencia de dos polimorfismos en el mismo gen *DRD2* sobre el aumento del QTc y la disminución en la TAD (Taq1A y C957T, respectivamente), siendo en ambos casos en los sujetos homocigotos mutados en los que se produjo un mayor aumento del QTc y una mayor disminución de la TAD, respectivamente. Estas diferencias farmacodinámicas en relación a la diferente actividad dopaminérgica no han sido descritas previamente.

A pesar de estos hallazgos, las asociaciones encontradas fueron débiles y de incierta relevancia clínica, sería necesario evaluar el papel de estos polimorfismos sobre la prolongación del intervalo QTc en estudios de dosis múltiple.

### 3.2 Análisis de la concentración de prolactina en plasma

El aumento de las concentraciones plasmáticas de prolactina es una RAM conocida y que se produce con relativa frecuencia durante el tratamiento con antipsicóticos debido al antagonismo que éstos ejercen sobre los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> (Haddad et al. 2004). El aripiprazol, al ser agonista parcial de estos receptores, tiene la capacidad de invertir la hiperprolactinemia causada por otros antipsicóticos como la paliperidona (Basterreche et al. 2012). Sin embargo, recientemente se han descrito varios casos de hiperprolactinemia asociados a aripiprazol, hecho que ha llevado a incluir este riesgo en la ficha técnica (Ficha técnica Abilify®, EMA). En nuestro estudio, el aripiprazol aumentó las concentraciones de prolactina. Además, tal y como era esperable, las mujeres presentaron mayores concentraciones de prolactina. Sin embargo, el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* no influyó en la secreción de prolactina, de forma concordante a otros estudios similares realizados previamente con aripiprazol (Nagai et al. 2012). Sin embargo, el efecto de este polimorfismo sí que ha sido previamente descrito con otros antipsicóticos tales como la risperidona y olanzapina (López-Rodríguez et al. 2011), donde los sujetos portadores del alelo A1 debido a su menor densidad de receptores presentaron mayores concentraciones de prolactina. En nuestro estudio, a pesar de haber una tendencia similar en los sujetos portadores del alelo mutado A1, estos resultados no se replicaron, lo que podría deberse al pequeño tamaño muestral de la población en general y más específicamente, de los sujetos portadores de esta variante que no es muy común en población caucásica.

## 4. SEGURIDAD Y TOLERABILIDAD

### 4.1 Influencia del sexo en las reacciones adversas

El papel que desempeña el sexo en la seguridad de los medicamentos ha sido analizado por varios grupos de investigación en diversos estudios, siendo en general las mujeres una población más susceptible al desarrollo de efectos adversos farmacológicos (Martin et al. 1998; Aichhorn et al. 2007; Nicolson et al. 2010). Las diferencias descritas en la tolerabilidad entre sexos podrían estar relacionadas con la diferente exposición a los fármacos entre hombres y mujeres (Nicolson et al. 2010; Kashuba et al. 1998). De hecho, en nuestro estudio, los valores de AUC y  $C_{\max}$  de aripiprazol fueron mayores en mujeres así como mayor fue la tasa de RAM en estas últimas, lo que podría sugerir que la mayor susceptibilidad en el sexo femenino está causada por unos niveles de fármaco en sangre más elevados.

### 4.2 Influencia de la farmacocinética en las reacciones adversas

Establecer una correlación entre los niveles del fármaco y el perfil de seguridad del mismo no siempre es fácil, y en el caso de aripiprazol hay pocos estudios publicados que evalúen la influencia de la farmacocinética en el perfil de seguridad de aripiprazol y además los resultados no son concluyentes. El estudio llevado a cabo por Mallikaarjun y cols. (Mallikaarjun et al. 2004) mostró una falta de asociación entre las RAM y los parámetros farmacocinéticos de aripiprazol mientras que en una revisión de 8 estudios (Sparshatt et al. 2010) se observó una correlación entre los niveles plasmáticos de aripiprazol y la ocupación de los receptores  $D_2/D_3$ . Los mayores niveles de AUC y  $C_{\max}$  de aripiprazol conducirían a una mayor ocupación de receptores dopaminérgicos y por tanto, a un mayor desarrollo de RAM. En esta revisión se establecen, además, 2 rangos de niveles plasmáticos de aripiprazol para las RAM con aripiprazol: en el primero (110–249 ng/mL) no se produjeron RAM o fueron de tipo leve mientras que el segundo rango (210–335 ng/mL) las RAM fueron de moderadas a severas. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio en el que se observó una clara relación entre el AUC y la  $C_{\max}$  de aripiprazol con el desarrollo de al menos una RAM y específicamente con el desarrollo de RAM gastrointestinales tales como las náuseas/vómitos. Como se ha explicado anteriormente, el mayor porcentaje

de este tipo de RAM en sujetos con mayores niveles de aripiprazol podría deberse a un mayor bloqueo dopaminérgico.

A pesar de que la suma de aripiprazol con el metabolito activo también se asoció con el desarrollo de RAM, los niveles del metabolito por sí solos no demostraron tener relación con la tolerabilidad al tratamiento. Sin embargo y, dado que el perfil farmacológico del dehidro-aripiprazol es similar a aripiprazol (Wood et al. 2006), se esperaría que las concentraciones del metabolito activo también influyesen en el desarrollo de RAM.

#### 4.3 Influencia de los polimorfismos genéticos en las reacciones adversas

El desarrollo de RAM con aripiprazol se relacionó con el polimorfismo Taq1A (gen *DRD2*) y con el -759C/T (gen *HTR2C*). Los sujetos homocigotos mutados A1/A1 desarrollaron RAM en mayor porcentaje, lo cual concuerda con lo descrito en la bibliografía ya que esta variante se ha asociado con una disminución en la densidad de receptores dopaminérgicos que predispone a una mayor tasa de efectos adversos (Suzuki et al. 2000) así como mayores valores de QTc y de prolactina. En el caso del polimorfismo -759C/T, los sujetos C/T y C/C desarrollaron más RAM en comparación con los T/T. El alelo C se relacionó con aumento de peso en el tratamiento con olanzapina en un estudio realizado en pacientes psiquiátricos aunque esta asociación no se replicó para clozapina y risperidona (Mulder et al. 2007). No hay estudios que evalúen el papel de esta variante sobre la seguridad del tratamiento con aripiprazol.

En nuestro estudio la variante His452Tyr (gen *HTR2A*) se asoció con el desarrollo de insomnio, siendo más frecuente en los sujetos C/T que en los C/C. Esta variante se ha relacionado con una modificación en la potencia de otros antipsicóticos atípicos como la risperidona (Davies et al. 2010) lo que podría afectar a la respuesta de estos medicamentos, tanto a nivel de eficacia como de seguridad.

Dos polimorfismos en el gen *ABCB1* (G2677T/A y C1236T) influyeron en el desarrollo de RAM de tipo general, siendo más frecuentes en los grupos mutados (A/A+A/T y T/T, respectivamente). Casualmente, fue en estos grupos donde se presentaron mayores concentraciones de aripiprazol y de la suma de aripiprazol y metabolito activo por lo que el mayor porcentaje de estas RAM estaría causado por unos mayores niveles de

fármaco en sangre e hipotéticamente, por unos mayores niveles de aripiprazol en el SNC debido a su paso a través de la BHE por una disminución de la función de la glicoproteína-P.

El desarrollo de RAM neurológicas estuvo influenciado por dos polimorfismos: T102C (gen *HTR2A*) y el *CYP3A5*\*3.

Los resultados de los estudios realizados sobre el efecto de la variante T102C en el desarrollo de RAM han arrojado resultados contradictorios. En nuestro estudio los sujetos heterocigotos para el polimorfismo T102C fueron más propensos a sufrir RAM neurológicas seguidos de los C/C y T/T, respectivamente. Hasta la fecha no hay estudios sobre la relación de esta variante y la seguridad de aripiprazol. Dos estudios realizados con risperidona (López-Rodríguez et al. 2013) y olanzapina (Ujike et al. 2008) reportaron una asociación del alelo T con una mayor predisposición al desarrollo de RAM, sin embargo, otro estudio realizado en pacientes con esquizofrenia (Segman et al. 2001) encontró asociación entre el alelo C y el desarrollo de discinesia tardía.

Dado que la enzima CYP3A5 también se expresa en el cerebro (Booth et al. 2013) la mayor tasa de RAM neurológicas, como los mareos, encontradas en los sujetos \*1/\*1 podrían deberse a un posible papel de esta enzima en el metabolismo cerebral de aripiprazol que conduciría a una modificación de la respuesta a este fármaco, como se ha descrito con otros psicofármacos como el alprazolam (Pai et al. 2002). Además, en estos sujetos las concentraciones de aripiprazol, del metabolito y la suma de ambos fueron mayores.

El desarrollo de náuseas/vómitos se relacionó con el polimorfismo -759C/T (gen *HTR2C*) y el fenotipo metabolizador del CYP2D6.

Los sujetos heterocigotos para el polimorfismo -759C/T desarrollaron más frecuentemente náuseas/vómitos en comparación con los homocigotos “*wild-type*” y mutados. No existen estudios hasta la fecha que analicen el papel de este polimorfismo en la seguridad del tratamiento con aripiprazol.

En los sujetos con menor capacidad metabolizadora del CYP2D6 (sujetos PM e IM) y que, por tanto, presentaron mayores concentraciones de aripiprazol, se produjeron con más frecuencia náuseas/vómitos, lo que estaría relacionado con un mayor bloqueo farmacológico causado por mayores concentraciones del fármaco.

Por último, cabe destacar el papel del polimorfismo Taq1A del gen *DRD2* en el desarrollo de RAM cardiovasculares, siendo nuevamente los sujetos A1/A1 los más afectados por el desarrollo de RAM.

Tras realizar el análisis multivariante, en el desarrollo de cualquier tipo de RAM influyeron tanto la farmacocinética (mayores valores de AUC de aripiprazol) como ciertos polimorfismos genéticos, siendo los grupos más susceptibles los genotipos \*1/\*1 (*CYP3A5*), A1/A1 (Taq1A, gen *DRD2*) y C/T (T102C y -759C/T, genes *HTR2A* y *HTR2C* respectivamente). Sin embargo, tras el análisis multivariante el sexo no afectó al desarrollo de RAM ya que el mayor porcentaje de RAM en el sexo femenino estaba causado únicamente por los mayores niveles de aripiprazol en este grupo.

Sin embargo, si nos centramos en el desarrollo de RAM específicas las variables que afectan a las mismas se modifican.

Por ejemplo, las náuseas/vómitos únicamente se vieron influenciadas por los mayores niveles de aripiprazol y por el sexo (más frecuentes en el grupo femenino) lo que está en sintonía con lo descrito anteriormente, pero no viéndose afectadas por ningún polimorfismo genético como sí se había descrito en el análisis bivariante. Sin embargo, en el desarrollo de RAM gastrointestinales que agrupa, además de las náuseas/vómitos, dolor abdominal y gastroenteritis, tras el análisis multivariante únicamente el AUC de aripiprazol y el polimorfismo -759C/T (gen *HTR2C*) fueron significativos, perdiendo la significación estadística tanto el sexo como el resto de polimorfismos que se habían descrito previamente. Este hecho se puede deber a que la mayor susceptibilidad al desarrollo de RAM gastrointestinales en las mujeres y en los genotipos que se habían descrito previamente únicamente estaba causada por las mayores concentraciones de aripiprazol en estos sujetos.

Los mareos se asociaron con el sexo (grupo femenino) y el polimorfismo *CYP3A5*\*3 que tal y como se ha mencionado anteriormente podría deberse a un papel de esta enzima en el metabolismo cerebral de aripiprazol, descartándose con este análisis la influencia de la farmacocinética en el desarrollo de mareos. Sin embargo, en el desarrollo de RAM neurológicas además de estar implicados los polimorfismos *CYP3A5*\*3 y T102C (gen *HTR2A*), también se encontró asociación con el polimorfismo Taq1A (genotipo A2/A2 del gen *DRD2*) y el AUC de aripiprazol (relación directamente proporcional).

En definitiva, y teniendo en cuenta estos resultados, podría decirse que no existe un modelo único que sea útil para predecir qué factores están implicados en las RAM cuando un sujeto recibe aripiprazol, pero sí que se puede concluir que tanto la farmacocinética, como el sexo y determinados polimorfismos genéticos están implicados en el desarrollo de las mismas en menor o mayor medida.

## **5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Este trabajo de investigación incluye 6 ensayos clínicos de bioequivalencia realizados en voluntarios sanos que recibieron una dosis única de aripiprazol.

Dado que se trata de un estudio realizado de dosis única en voluntarios sanos su principal limitación es la incapacidad para evaluar la influencia de los polimorfismos genéticos sobre la eficacia del tratamiento y los efectos adversos propios del tratamiento crónico con antipsicóticos tales como los síntomas extrapiramidales, el aumento de peso o la diabetes.

Además, consideramos que el tiempo de muestreo para el metabolito activo fue insuficiente para una adecuada evaluación del AUC y de su eliminación.

Sin embargo, nuestro estudio también presenta ventajas frente a los realizados en pacientes psiquiátricos ya que permite evaluar el efecto de los polimorfismos genéticos en la respuesta a aripiprazol sin la interferencia de factores de confusión que habitualmente se dan en los estudios realizados en pacientes tales como las propias características patológicas de la enfermedad, la terapia concomitante, el consumo de tabaco, otras sustancias que puedan ser inductores o inhibidores enzimáticos o la falta de motivación en este tipo de pacientes.

Además, se trata de un estudio exhaustivo y completo que integra información relativa a la farmacocinética, farmacodinamia, seguridad y farmacogenética de aripiprazol y hasta la fecha no existen estudios que recojan todos estos análisis de manera conjunta en una única población.

Además, el riguroso análisis estadístico multivariante llevado a cabo permite controlar la interferencia de posibles variables de confusión.

Es importante tener en cuenta que los resultados presentados deben ser interpretados con cautela ya que la farmacocinética, farmacodinamia y tolerabilidad pueden ser diferentes en pacientes psiquiátricos que reciben este tratamiento de manera crónica en comparación con voluntarios sanos. Es necesario que se realicen estudios más amplios para confirmar estos resultados, especialmente para aquellos genotipos menos frecuentes. Además, los resultados obtenidos requieren de una posterior validación en la población diana del tratamiento con aripiprazol.

## VI. CONCLUSIONES

---





## CONCLUSIONES

1. Las frecuencias alélicas de los genes analizados en nuestra población de voluntarios sanos son similares en su mayoría a las descritas en población española y caucásica.
2. La farmacocinética de aripiprazol se vio afectada en su mayor parte por el fenotipo del CYP2D6, siendo el aclaramiento menor a medida que disminuye el número de alelos activos. Además, también se observó una reducción de la eliminación en mujeres y en sujetos homocigotos mutados T/T para el polimorfismo C1236T del gen *ABCB1*.
3. La farmacocinética de dehidro-aripiprazol estuvo modulada por el fenotipo del CYP2D6 y el SNP C1236T del gen *ABCB1*, alcanzando concentraciones más bajas en los sujetos con menos alelos activos del gen *CYP2D6* y en los sujetos homocigotos mutados T/T para el polimorfismo C1236T.
4. El fenotipo del CYP2D6 y el genotipo del CYP3A5 afectaron al ratio del AUC dehidro-aripiprazol/aripiprazol, que fue menor en los sujetos con reducción de la actividad enzimática: PM e IM (CYP2D6) y \*3\*/3 (*CYP3A5*).
5. El único sujeto portador del alelo CYP3A4\*20 mostraba una reducción importante del aclaramiento de aripiprazol.
6. Las mujeres y los sujetos con mayor AUC y  $C_{\max}$  de aripiprazol fueron más propensos al desarrollo de RAM.
7. Durante el tratamiento con aripiprazol las RAM fueron más frecuentes en los sujetos \*1/\*1 (*CYP3A5*\*3), A1/A1 (Taq1A, gen *DRD2*), C/T (T102C, gen *HTR2A*) y C/T (-759C/T, gen *HTR2C*).
8. Las concentraciones del metabolito activo, dehidro-aripiprazol, no influyeron en el desarrollo de RAM.
9. El aripiprazol produjo un descenso en la tensión arterial y un aumento en la FC y en el intervalo QTc, existiendo una relación entre el AUC de aripiprazol y la disminución de la tensión arterial y el aumento de la FC pero no con el aumento del intervalo QTc.

- 10.** El sexo influyó en los cambios de tensión arterial, FC y QTc, siendo en las mujeres mayores los valores de FC y QTc y menores los valores de la tensión arterial.
- 11.** El aumento del QTc fue mayor en los sujetos A1/A1 para el polimorfismo Taq1A (gen *DRD2*) mientras que la disminución de la TAD fue más pronunciada en las mujeres y en los sujetos T/T para el polimorfismo C957T.
- 12.** Tras la administración de aripiprazol se observó un ligero aumento de las concentraciones de prolactina, que fue mayor en las mujeres, pero no estuvo relacionado con el polimorfismo Taq1A del gen *DRD2*.

# BIBLIOGRAFÍA

---



- Aceti A, Gianserra L, Lambiase L, Pennica A, Teti E. Pharmacogenetics as a tool to tailor antiretroviral therapy: A review. *World J Virol*. 2015 Aug 12;4(3):198-208.
- Agúndez JA, Ledesma MC, Ladero JM, Benítez J. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther*. 1995 Mar;57(3):265-9.
- Aichhorn W, Whitworth AB, Weiss EM, Marksteiner J. Second-generation antipsychotics: is there evidence for sex differences in pharmacokinetic and adverse effect profiles? *Drug Saf*. 2006;29:587–598.
- Aichhorn W, Whitworth AB, Weiss EM, Hinterhuber H, Marksteiner J. [Differences between men and women in side effects of second-generation antipsychotics]. *Nervenarzt*. 2007 Jan;78(1):45-52.
- Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Jul;278(1):441-6.
- American Psychiatric Association. *Diagnosis and statistical manual of mental disorders*, 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994.
- Amur S, Frueh FW, Lesko LJ, Huang SM. Integration and use of biomarkers in drug development, regulation and clinical practice: a US regulatory perspective. *Biomark Med*. 2008 Jun;2(3):305-11.
- Apellániz-Ruiz M, Inglada-Pérez L, Naranjo ME, Sánchez L, Mancikova V, Currás-Freixes M, et al. High frequency and founder effect of the CYP3A4\*20 loss-of-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. *Pharmacogenomics J*. 2015 Jun;15(3):288-92.
- Arranz MJ, Munro J, Sham P, Kirov G, Murray RM, Collier DA, et al. Meta-analysis of studies on genetic variation in 5-HT<sub>2A</sub> receptors and clozapine response. *Schizophr Res*. 1998 Jul 27;32(2):93-9. (A).
- Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham PC, Zhao J, et al. Evidence for association between polymorphisms in the promoter and coding regions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and response to clozapine. *Mol Psychiatry*. 1998 Jan;3(1):61-6. (B).
- Arneth B, Shams M, Hiemke C, Härtter S. Rapid and reliable genotyping procedure for detection of alleles with mutations, deletion, or/and duplication of the CYP2D6 gene. *Clin Biochem*. 2009 Aug;42(12):1282-90.
- Azuma J, Hasunuma T, Kubo M, Miyatake M, Koue T, Higashi K, et al. The relationship between clinical pharmacokinetics of aripiprazole and CYP2D6 genetic polymorphism: effects of CYP enzyme inhibition by coadministration of paroxetine or fluvoxamine. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012 Jan;68(1):29-37.
- Bachmann CJ, Rieger-Gies A, Heinzl-Gutenbrunner M, Hiemke C, Remschmidt H, Theisen FM. Large variability of aripiprazole and dehydroaripiprazole serum concentrations in adolescent patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit*. 2008 Aug;30(4):462-6.
- Basterreche N, Zumárraga M, Arrue A, Olivas O, Dávila W. Aripiprazole reverses paliperidone-induced hyperprolactinemia. *Actas Esp Psiquiatr*. 2012 Sep-Oct;40(5):290-2.
- Bazett HC. An analysis of time relations of the electrocardiogram. *Heart*. 1920;7:353–370.
- Belmonte C, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T, Talegón M, Sánchez-Rojas SD, Abad-Santos F. Evaluation of the Relationship Between Pharmacokinetics and the Safety of Aripiprazole and

Its Cardiovascular Effects in Healthy Volunteers. *J Clin Psychopharmacol*. 2016 Dec;36(6):608-614.

Belmonte C, Ochoa D, Román M, Saiz-Rodríguez M, Wojnicz A, Gómez-Sánchez CI, Martín-Vílchez S, Abad-Santos F. Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms on Pharmacokinetics and Safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018 Jun;122(6):596-605.

Bernal ML, Sinues B, Johansson I, McLellan RA, Wennerholm A, Dahl ML et al. Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics*. 1999 Oct;9(5):657-60.

Bernal ML, Sinues B, Fanlo A, Mayayo E. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. *Ther Drug Monit*. 2003 Feb;25(1):107-11.

Blasi G, Selvaggi P, Fazio L, Antonucci LA, Taurisano P, Masellis R, et al. Variation in Dopamine D2 and Serotonin 5-HT2A Receptor Genes is Associated with Working Memory Processing and Response to Treatment with Antipsychotics. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Jun;40(7):1600-8.

Booth Depaz IM, Toselli F, Wilce PA, Gillam EM. Differential expression of human cytochrome P450 enzymes from the CYP3A subfamily in the brains of alcoholic subjects and drug-free controls. *Drug Metab Dispos* 2013;41:1187-94.

Borras L, Constant EL, Eytan A, Huguelet P. Hypertension and aripiprazole. *Am J Psychiatry*. 2005 Dec;162(12):2392.

Bosch TM, Huitema AD, Doodeman VD, Jansen R, Witteveen E, Smit WM et al. Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* 2006;12(19):5786-93.

Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T, et al. Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jul;302(1):381-9.

Chen SF, Shen YC, Chen CH. Effects of the DRD3 Ser9Gly polymorphism on aripiprazole efficacy in schizophrenic patients as modified by clinical factors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009a Apr 30;33(3):470-4.

Chen SF, Shen YC, Chen CH. HTR2A A-1438G/T102C polymorphisms predict negative symptoms performance upon aripiprazole treatment in schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009b Aug;205(2):285-92.

Citrome L, Josiassen R, Bark N, Salazar DE, Mallikaarjun S. Pharmacokinetics of aripiprazole and concomitant lithium and valproate. *J Clin Pharmacol*. 2005 Jan;45(1):89-93.

Citrome L, Macher JP, Salazar DE, Mallikaarjun S, Boulton DW. Pharmacokinetics of aripiprazole and concomitant carbamazepine. *J Clin Psychopharmacol*. 2007 Jun;27(3):279-83.

Correia C, Santos P, Coutinho AM, Vicente AM. Characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6 and ABCB1 gene polymorphisms in a Portuguese population sample. *Cell Biochem Funct*. 2009 Jun;27(4):251-5.

Dahl ML, Johansson I, Porsmyr Palmertz M, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to debrisoquine and desipramine hydroxylation in a Swedish population. *Clin Pharmacol Ther* 1992;51:12-7.

Darpo B, Karnad DR, Badilini F, Florian J, Garnett CE, Kothari S, Panicker GK, Sarapa N. Are women more susceptible than men to drug-induced QT prolongation? Concentration-QTc modelling in a phase 1 study with oral rac-sotalol. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Mar;77(3):522-31.

- Daudén Tello E. [Pharmacogenetics I. Concept, history, objectives and areas of study]. *Actas Dermosifiliogr*. 2006 Dec;97(10):623-9.
- Davies MA, Conley Y, Roth BL. Functional SNPs in genes encoding the 5-HT<sub>2A</sub> receptor modify the affinity and potency of several atypical antipsychotic drugs. *Biol Res Nurs*. 2011-Jan;13(1):55-60.
- DeFinetti program. Disponible en: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Acceso: Abril de 2017.
- Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010 Nov 22;(45).
- Di Sciascio G, Riva MA. Aripiprazole: from pharmacological profile to clinical use. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015 Oct 13;11:2635-47.
- Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:149-73.
- Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM. Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci*. 2001 Apr;90(4):397-421.
- Drici MD, Priori S. Cardiovascular risks of atypical antipsychotic drug treatment. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2007 Aug;16(8):882-90.
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet*. 2003 Feb 1;12(3):205-16.
- Eichelbaum M, Mineshita S, Ohnhaus EE, Zekor C. The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation. *Br J Clin Pharmacol* 1986;22:49-53.
- Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RH. CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics*. 2013 Jan;14(1):47-62.
- Ellingrod VL, Perry PJ, Ringold JC, Lund BC, Bever-Stille K, Fleming F, Holman TL, Miller D. Weight gain associated with the -759C/T polymorphism of the 5HT<sub>2C</sub> receptor and olanzapine. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 Apr 5;134B(1):76-8.
- European Medicines Agency. Abilify Label (2014). Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000471/WC500020170.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000471/WC500020170.pdf) Acceso: 1 de Julio de 2015.
- European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the investigation of bioequivalence. London, 20 January 2010. Doc. Ref.: CPMP/QWP/EWP/1401/98 Rev.
- European Medicines Agency. Note for guidance on definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. EMEA/CHMP/ICH/437986/2006.
- Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine. 2007. Disponible en: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table> . Acceso: 15 de Abril de 2018.
- Flórez J, Armijo, J. A., Mediavilla, A. *Farmacología humana*. 5ª edición. Ed: Masson. Barcelona; 2008.



Food and Drug Administration. Aripiprazole label (2014). Disponible en: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/021436s038,021713s030,021729s022,021866s023lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021436s038,021713s030,021729s022,021866s023lbl.pdf) Acceso: 01 de Julio de 2017.

Food and Drug Administration. Drug Approval Package: Abilify (Aripiprazole). Disponible en: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2002/21-436\\_abilify.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2002/21-436_abilify.cfm). Acceso: Abril de 2015.

Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Nov 18;54(10):1295-310.

Fujii K, Ozeki Y, Okayasu H, Takano Y, Shinozaki T, Hori H, et al. QT is longer in drug-free patients with schizophrenia compared with age-matched healthy subjects. *PLoS One.* 2014 Jun 2;9(6):e98555.

Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Feb;83(2):234-42.

Garijo B, de Abajo FJ, Castro MA, Lopo CR, Carcas A, Frías J. [Hospitalizations because of drugs: a prospective study]. *Rev Clin Esp.* 1991 Jan;188(1):7-12.

Gervasini G, Vizcaino S, Gasiba C, Carrillo JA, Benitez J. Differences in CYP3A5\*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and Other Caucasian populations. *Ther Drug Monit.* 2005 Dec;27(6):819-21.

Gesteira A, Barros F, Martín A, Pérez V, Cortés A, Baiget M, et al. Pharmacogenetic studies on the antipsychotic treatment. Current status and perspectives. *Actas Esp Psiquiatr.* 2010 Sep-Oct;38(5):301-16.

Goodnick PJ, Jerry JM. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother.* 2002;3:1773-1781.

Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, et al. The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet.* 1989 Nov;45(5):778-85.

Guimarães AP, Zeni C, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Rohde LA et al. Serotonin genes and attention deficit/hyperactivity disorder in a Brazilian sample: preferential transmission of the HTR2A 452His allele to affected boys. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007 Jan 5;144B(1):69-73.

Gulisano M, Calì PV, Cavanna AE, Eddy C, Rickards H, Rizzo R. Cardiovascular safety of aripiprazole and pimozide in young patients with Tourette syndrome. *Neurol Sci.* 2011 Dec;32(6):1213-7.

Gunes A, Spina E, Dahl ML, Scordo MG. ABCB1 polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety. *Ther Drug Monit.* 2008 Oct;30(5):628-33.

Güzey C, Lopez-Rodriguez R, Myhre R, Spigset O. Allele and genotype frequencies of serotonin and dopamine transporter and receptor polymorphisms in a Norwegian population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011 Jul-Aug;15(7-8):557-63.

Haddad PM, Anderson IM. Antipsychotic-related QTc prolongation, torsade de pointes and sudden death. *Drugs.* 2002;62:1649-71.

Haddad PM, Wieck A. Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: mechanisms, clinical features and management. *Drugs.* 2004;64(20):2291-314.

- Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908 Jul 10;28(706):49-50.
- Hart EC, Charkoudian N, Wallin BG, Curry TB, Eisenach JH, Joyner MJ. Sex differences in sympathetic neural-hemodynamic balance: implications for human blood pressure regulation. *Hypertension*. 2009 Mar;53(3):571-6.
- Hategan A, Bourgeois JA. Aripiprazole-associated QTc prolongation in a geriatric patient. *J Clin Psychopharmacol*. 2014 Dec;34(6):766-8.
- Heffernan KS, Jae SY, Lee M, Mojtahedi M, Evans EM, Zhu W, et al. Gender differences in QTc interval in young, trained individuals with lower spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2007 Jul;45(7):518-21.
- Heim MH, Meyer UA. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics*. 1992 Sep;14(1):49-58.
- Hendset M, Hermann M, Lunde H, Refsum H, Molden E. Impact of the CYP2D6 genotype on steady-state serum concentrations of aripiprazole and dehydroaripiprazole. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007 Dec;63(12):1147-51.
- Hill MJ, Reynolds GP. Functional consequences of two HTR2C polymorphisms associated with antipsychotic-induced weight gain. *Pharmacogenomics*. 2011 May;12(5):727-34.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3473-8.
- Huang W, Lin YS, McConn DJ 2nd, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N, et al. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos*. 2004 Dec;32(12):1434-45.
- Huertas E, Bühler KM, Echeverry-Alzate V, Giménez T, López-Moreno JA. C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor gene is associated with motor learning and heart rate. *Genes Brain Behav*. 2012 Aug;11(6):677-83.
- Hutson WR, Roehrkasse RL, Wald A. Influence of gender and menopause on gastric emptying and motility. *Gastroenterology* 1989;96:11-17.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline E14 (2005). The Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-antiarrhythmic Drugs. Disponible en: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Efficacy/E14/E14\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E14/E14_Guideline.pdf) Acceso: Septiembre de 2015.
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Aug;20(8):342-9.
- Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Apr;25(4):193-200.
- Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6-13.
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit*. 2005 Jul-Aug;19(4):333-41.

International Transporter Consortium., Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Mar;9(3):215-36.

International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):753-64.

Iribarren C, Round AD, Peng JA, Lu M, Zaroff JG, Holve TJ, et al. Validation of a population-based method to assess drug-induced alterations in the QT interval: a self-controlled crossover study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013 Nov;22(11):1222-32.

Jensen KG, Juul K, Fink-Jensen A, Correll CU, Pagsberg AK. Corrected QT changes during antipsychotic treatment of children and adolescents: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2015 Jan;54(1):25-36.

Jeon JY, Chae SW, Kim MG. Population pharmacokinetics of aripiprazole in healthy Korean subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016;54(4):293-304.

Johnson JA, Burkley BM, Langae TY, Clare-Salzler MJ, Klein TE, Altman RB. Implementing personalized medicine: development of a cost-effective customized pharmacogenetics genotyping array. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Oct;92(4):437-9.

Jordan S, Koprivica V, Chen R, Tottori K, Kikuchi T, Altar CA. The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Eur J Pharmacol*. 2002;441:137–140.

Kane JM. Schizophrenia. *N Engl J Med* 1996; 334: 34-41.

Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. Relationship between dopamine D<sub>2</sub> occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000 Apr;157(4):514-20.

Karch FE, Lasagna, L. Toward the operational identification of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1977;21:247-254.

Kashuba AD, Nafziger AN. Physiological changes during the menstrual cycle and their effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34:203–218.

Kim JR, Seo HB, Cho JY, Kang DH, Kim YK, Bahk WM, et al. Population pharmacokinetic modelling of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in psychiatric patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Dec;66(6):802-10. (A).

Kim E, Kwon JS, Shin YW, Lee JS, Kang WJ, Jo HJ, et al. Taq1A polymorphism in the dopamine D<sub>2</sub> receptor gene predicts brain metabolic response to aripiprazole in healthy male volunteers. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Feb;18(2):91-7. (B).

Kim B, Choi EY, Kim CY, Song K, Joo YH. Could HTR2A T102C and DRD3 Ser9Gly predict clinical improvement in patients with acutely exacerbated schizophrenia? Results from treatment responses to risperidone in a naturalistic setting. *Hum Psychopharmacol*. 2008 Jan;23(1):61-7. (C).

Kirschbaum KM, Müller MJ, Malevani J, Mobascher A, Burchardt C, Piel M, et al. Serum levels of aripiprazole and dehydroaripiprazole, clinical response and side effects. *World J Biol Psychiatry*. 2008;9(3):212-8.

Kirschbaum KM, Uhr M, Holthoewer D, Namendorf C, Pietrzik C, Hiemke C, et al. Pharmacokinetics of acute and sub-chronic aripiprazole in P-glycoprotein deficient mice. *Neuropharmacology*. 2010 Nov;59(6):474-9.

- Koenig J, Thayer JF. Sex differences in healthy human heart rate variability: A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 May;64:288-310.
- Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, et al. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics*. 1994 Oct;4(5):247-59.
- Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, et al; Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*. 2003 Aug;13(8):481-94.
- Kubo M, Koue T, Inaba A, Takeda H, Maune H, Fukuda T, et al. Influence of itraconazole co-administration and CYP2D6 genotype on the pharmacokinetics of the new antipsychotic ARIPIRAZOLE. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2005 Feb;20(1):55-64.
- Kubo M, Koue T, Maune H, Fukuda T, Azuma J. Pharmacokinetics of aripiprazole, a new antipsychotic, following oral dosing in healthy adult Japanese volunteers: influence of CYP2D6 polymorphism. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2007 Oct;22(5):358-66.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001 Apr;27(4):383-91.
- Kwon JS, Kim E, Kang DH, Choi JS, Yu KS, Jang IJ, et al; APLUS study group. Taq1A polymorphism in the dopamine D2 receptor gene as a predictor of clinical response to aripiprazole. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008 Dec;18(12):897-907.
- Laine K, Tybring G, Härtter S, Andersson K, Svensson JO, Widén J, et al. Inhibition of cytochrome P4502D6 activity with paroxetine normalizes the ultrarapid metabolizer phenotype as measured by nortriptyline pharmacokinetics and the debrisoquin test. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Oct;70(4):327-35.
- Lamba J, Strom S, Venkataramanan R, Thummel KE, Lin YS, Liu W, et al. MDR1 genotype is associated with hepatic cytochrome P450 3A4 basal and induction phenotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Apr;79(4):325-38.
- Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Jul;22(7):555-8.
- Lane HY., Hsu SK., Liu YC., Chang YC., Huang CH., Chang WH. Dopamine D3 receptor Ser9Gly polymorphism and risperidone response. *J Clin Psychopharmacol*. 2005;25:6-11.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*. 1998 Apr 15;279(15):1200-5.
- Lerer B, Segman RH, Fangerau H, Daly AK, Basile VS, Cavallaro R, et al. Pharmacogenetics of tardive dyskinesia: combined analysis of 780 patients supports association with dopamine D3 receptor gene Ser9Gly polymorphism. *Neuropsychopharmacology*. 2002 Jul;27(1):105-19.
- Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 2007;7:154-79.
- Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*. 2013 Sep 14;382(9896):951-62.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, et al. Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of

- antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med.* 2005 Sep 22;353(12):1209-23. Erratum in: *N Engl J Med.* 2010 Sep 9;363(11):1092-3.
- Lin SK, Chen CK, Liu YL. Aripiprazole and dehydroaripiprazole plasma concentrations and clinical responses in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol.* 2011 Dec;31(6):758-62.
- Llerena A, Dorado P, Penas-Lledo EM, Caceres MC, De la Rubia A. Low frequency of CYP2D6 poor metabolizers among schizophrenia patients. *Pharmacogenomics J* 2007;7:408-410.
- LLerena A, Naranjo ME, Rodrigues-Soares F, Penas-Lledó EM, Fariñas H, Tarazona-Santos E. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014 Nov;10(11):1569-83.
- López-Rodríguez R, Román M, Novalbos J, Pelegrina ML, Ochoa D, Abad-Santos F. DRD2 Taq1A polymorphism modulates prolactin secretion induced by atypical antipsychotics in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol.* 2011 Oct;31(5):555-62.
- López-Rodríguez R, Cabaleiro T, Ochoa D, Román M, Borobia AM, Carcas A et al. Pharmacodynamic genetic variants related to antipsychotic adverse reactions in healthy volunteers. *Pharmacogenomics.* 2013 Jul;14(10):1203-14.
- Lundstrom K., Turpin MP. Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;23:225:1068–1072.
- Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev.* 2011 Jun;63(2):437-59.
- Madhusoodanan S, Velama U, Parmar J, Goia D, Brenner R. A current review of cytochrome P450 interactions of psychotropic drugs. *Ann Clin Psychiatry.* 2014 May;26(2):120-38.
- Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002 Mar 2;359(9308):727-32.
- Mallikaarjun S, Salazar DE, Bramer SL. Pharmacokinetics, tolerability, and safety of aripiprazole following multiple oral dosing in normal healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2004 Feb;44(2):179-87.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacología.* 7ª edición. Elsevier Churchill Livingstone; 2012.
- Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, Piccinni A, Carlini M, Vatteroni E et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic drugs: effect of sex. *CNS Spectr* 2013;18(3):118-27.
- Martin RM, Biswas PN, Freemantle SN, Pearce GL, Mann RD. Age and sex distribution of suspected adverse drug reactions to newly marketed drugs in general practice in England: analysis of 48 cohort studies. *Br J Clin Pharmacol.* 1998 Nov;46(5):505-11.
- Martin MA, Hoffman JM, Freimuth RR, Klein TE, Dong BJ, Pirmohamed M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for HLA-B Genotype and Abacavir Dosing: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 May;95(5):499-500.
- Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, Xie R, Baker SD, Verweij J et al. Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 2003;9(9):3246-53.
- McGavin JK, Goa KL. Aripiprazole. *CNS Drugs.* 2002;16(11):779-86; discussion 787-8.
- McGraw J, Waller D. Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012 Mar;8(3):371-82.

- Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct*. 2006 Sep-Oct;24(5):381-5.
- Molden E, Lunde H, Lunder N, Refsum H. Pharmacokinetic variability of aripiprazole and the active metabolite dehydroaripiprazole in psychiatric patients. *Ther Drug Monit*. 2006 Dec;28(6):744-9.
- Moons T, de Roo M, Claes S, Dom G. Relationship between P-glycoprotein and second-generation antipsychotics. *Pharmacogenomics* 2011;12(8):1193-211.
- Muench J, Hamer AM. Adverse effects of antipsychotic medications. *Am Fam Physician*. 2010 Mar 1;81(5):617-22.
- Mueser KT, McGurk SR. Schizophrenia. *Lancet*. 2004 Jun 19;363(9426):2063-72.
- Mulder H, Franke B, van der-Beek van der AA, Arends J, Wilmink FW, Egberts AC, et al. The association between HTR2C polymorphisms and obesity in psychiatric patients using antipsychotics: a cross-sectional study. *Pharmacogenomics J*. 2007 Oct; 7(5):318-24.
- Nagai G, Mihara K, Nakamura A, Suzuki T, Nemoto K, Kagawa S, et al. Prolactin concentrations during aripiprazole treatment in relation to sex, plasma drugs concentrations and genetic polymorphisms of dopamine D2 receptor and cytochrome P450 2D6 in Japanese patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2012 Oct;66(6):518-24.
- Naranjo ME, de Andrés F, Delgado A, Cobaleda J, Peñas-Lledó EM, Llerena A. High frequency of CYP2D6 ultrarapid metabolizers in Spain: controversy about their misclassification in worldwide population studies. *Pharmacogenomics J*. 2016 Oct;16(5):485-90.
- Nelson DR. Cytochrome P450s in humans. *Human Genomics*. 2009;4:59-65. Disponible en: <http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html> Acceso: 19 de Enero de 2018.
- Nelson S, Leung JG. Torsades de pointes after administration of low-dose aripiprazole. *Ann Pharmacother*. 2013 Feb;47(2):e11.
- Nicolson TJ, Mellor HR, Roberts RR. Gender differences in drug toxicity. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31:108–114.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R. R., Willard, H. F & Hamosh A. Thompson & Thompson *Genetica en Medicina*. Elsevier Masson, 7ªEd. 2008
- Olajosy-Hilkesberger L, Godlewska B, Schosser-Haupt A, Olajosy M, Wojciorowski J, Landowski J, et al. Polymorphisms of the 5-HT2A receptor gene and clinical response to olanzapine in paranoid schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2011;64(4):202-10.
- Oliva-Moreno J, López-Bastida J, Montejo-González AL, Osuna-Guerrero R, Duque-González B. The socioeconomic costs of mental illness in Spain. *Eur J Health Econ*. 2009 Oct;10(4):361-9.
- Olsen RB, Bruehl S, Nielsen CS, Rosseland LA, Eggen AE, Stubhaug A. Gender differences in blood pressure-related hypoalgesia in a general population: the Tromsø Study. *J Pain*. 2013 Jul;14(7):699-708.
- Ozdemir V, Kalow W, Tang BK, Paterson AD, Walker SE, Endrenyi L, et al. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics*. 2000; 10:373–388.
- Ozdemir V, Gunes A, Dahl ML, Scordo MG, Williams-Jones B, Someya T. Could endogenous substrates of drug-metabolizing enzymes influence constitutive physiology and drug target responsiveness? *Pharmacogenomics*. 2006 Dec;7(8):1199-210.



- Pai HV, Upadhyaya SC, Chinta SJ, Hegde SN, Ravindranath V. Differential metabolism of alprazolam by liver and brain cytochrome (P4503A) to pharmacologically active metabolite. *Pharmacogenomics J* 2002;2:243–58.
- Patteet L, Morrens M, Maudens KE, Niemegeers P, Sabbe B, Neels H. Therapeutic drug monitoring of common antipsychotics. *Ther Drug Monit.* 2012 Dec;34(6):629-51.
- Pigott TA, Carson WH, Saha AR, Torbeyns AF, Stock EG, Ingenito GG; Aripiprazole Study Group.. Aripiprazole for the prevention of relapse in stabilized patients with chronic schizophrenia: a placebo-controlled 26-week study. *J Clin Psychiatry.* 2003 Sep;64(9):1048-56.
- Pohjalainen T, Rinne JO, Någren K, Lehtikainen P, Anttila K, Syvälahti EK, et al. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry.* 1998 May;3(3):256-60.
- Polcwiartek C, Sneider B, Graff C, Taylor D, Meyer J, Kanters JK, et al. The cardiac safety of aripiprazole treatment in patients at high risk for torsade: a systematic review with a meta-analytic approach. *Psychopharmacology (Berl).* 2015 Sep;232(18):3297-308.
- Rabkin SW. Impact of Age and Sex on QT Prolongation in Patients Receiving Psychotropics. *Can J Psychiatry.* 2015;60:206-14.
- Rafaniello C, Sessa M, Bernardi FF, Pozzi M, Cheli S, Cattaneo D et al. The predictive value of ABCB1, ABCG2, CYP3A4/5 and CYP2D6 polymorphisms for risperidone and aripiprazole plasma concentrations and the occurrence of adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J* 2017 Jul 18.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J. M. *Farmacología*. 7ª edición. Elsevier Churchill Livingstone; 2012.
- Rasmussen-Torvik LJ, Stallings SC, Gordon AS, Almoguera B, Basford MA, Bielinski SJ, et al. Design and anticipated outcomes of the eMERGE-PGx project: a multicenter pilot for preemptive pharmacogenomics in electronic health record systems. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Oct;96(4):482-9.
- Raully-Lestienne I, Boutet-Robinet E, Ailhaud MC, Newman-Tancredi A, Cussac D. Differential profile of typical, atypical and third generation antipsychotics at human 5-HT7a receptors coupled to adenylyl cyclase: detection of agonist and inverse agonist properties. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2007 Oct;376(1-2):93-105.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006 Nov 23;444(7118):444-54.
- Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med.* 2004 ;350:1013-22.
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997 Feb;60(2):284-95.
- Sadock BJ; Sadock VA; Kaplan HI. *Kaplan & Sadock's pocket handbook of clinical psychiatry*. 5ªed: Lippincott Williams & Wilkins. 2010.
- Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Jiang-Zheng C, Koller D, Mejía G, Zubiaur P, Wojnicz A, Abad-Santos F. Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on pharmacokinetics of antipsychotics and antidepressants. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2018 May 3. [Epub ahead of print]
- Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res.* 2001 Oct;18(10):1400-4.

- Sayyaparaju KK, Grunze H, Fountoulakis KN. When to start aripiprazole therapy in patients with bipolar mania. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10: 459–470.
- Scharfetter J, Chaudhry HR, Hornik K, Fuchs K, Sieghart W, Kasper S, et al. Dopamine D3 receptor gene polymorphism and response to clozapine in schizophrenic Pakistani patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1999 Dec;10(1):17-20.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
- Schwartz JB. The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:107-21.
- Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res*. 2004 Aug;50(2):195-200.
- Segman RH, Heresco-Levy U, Finkel B, Goltser T, Shalem R, Schlafman M, et al. Association between the serotonin 2A receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2001 Mar;6(2):225-9.
- Shah RR. Drug-induced prolongation of the QT interval: regulatory dilemmas and implications for approval and labelling of a new chemical entity. *Fundam Clin Pharmacol*. 2002;16:147–156.
- Shapiro DA, Renock S, Arrington E, Chiodo LA, Liu LX, Sibley DR, et al. Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Aug;28(8):1400-11.
- Shen YC, Chen SF, Chen CH, Lin CC, Chen SJ, Chen YJ, et al. Effects of DRD2/ANKK1 gene variations and clinical factors on aripiprazole efficacy in schizophrenic patients. *J Psychiatr Res*. 2009 Mar;43(6):600-6.
- Shim JC, Shin JG, Kelly DL, Jung DU, Seo YS, Liu KH, et al. Adjunctive treatment with a dopamine partial agonist, aripiprazole, for antipsychotic-induced hyperprolactinemia: a placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry*. 2007 Sep; 164(9):1404-10.
- Sinues B, Vicente J, Fanlo A, Vasquez P, Medina JC, Mayayo E, et al. CYP3A5\*3 and CYP3A4\*1B allele distribution and genotype combinations: differences between Spaniards and Central Americans. *Ther Drug Monit*. 2007 Aug;29(4):412-6.
- Sparshatt A, Taylor D, Patel MX, Kapur S. A systematic review of aripiprazole--dose, plasma concentration, receptor occupancy, and response: implications for therapeutic drug monitoring. *J Clin Psychiatry*. 2010 Nov;71(11):1447-56.
- Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*. 2001 May;7(5):201-4.
- Stahl SM. Dopamine system stabilizers, aripiprazole, and the next generation of antipsychotics, part 1, "Goldilocks" actions at dopamine receptors. *J Clin Psychiatry*. 2001. (A)
- Stahl SM. Dopamine system stabilizers, aripiprazole, and the next generation of antipsychotics, part 2: illustrating their mechanism of action. *J Clin Psychiatry*. 2001 Dec;62(12):923-4. (B)
- Steiner E, Bertilsson L, Säwe J, Bertling I, Sjöqvist F. Polymorphic debrisoquin hydroxylation in 757 Swedish subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1988 Oct;44(4):431-5.
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*. 2001 Jul 20;293(5529):489-93.
- Stingl JC, Brockmüller J, Viviani R. Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. *Mol Psychiatry*. 2013 Mar;18(3):273-87.



- Stingl J, Viviani R. Polymorphism in CYP2D6 and CYP2C19, members of the cytochrome P450 mixed-function oxidase system, in the metabolism of psychotropic drugs. *J Intern Med*. 2015 Feb;277(2):167-77.
- Stöllberger C, Huber JO, Finsterer J. Antipsychotic drugs and QT prolongation. *Int Clin Psychopharmacol*. 2005;20:243-51.
- Suzuki A, Mihara K, Kondo T, Tanaka O, Nagashima U, Otani K et al. The relationship between dopamine D2 receptor polymorphism at the Taq1 A locus and therapeutic response to nemonapride, a selective dopamine antagonist, in schizophrenic patients. *Pharmacogenetics*. 2000 Jun;10(4):335-41.
- Suzuki Y, Sugai T, Ono S, Sawamura K, Fukui N, Watanabe J, Tsuneyama N, Someya T. Changes in the metabolic parameters and QTc interval after switching from olanzapine to aripiprazole in Japanese patients with stable schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 2011 Aug;31(4):526-8. (A).
- Suzuki Y, Ono S, Fukui N, Sugai T, Watanabe J, Tsuneyama N, Someya T. Dose-dependent increase in the QTc interval in aripiprazole treatment after risperidone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Mar 30;35(2):643-4. (B).
- Suzuki Y, Sugai T, Fukui N, Watanabe J, Ono S, Tsuneyama N, Saito M, Someya T. Sex differences in the effect of four second-generation antipsychotics on QTc interval in patients with schizophrenia. *Hum Psychopharmacol*. 2013 May;28(3):215-9.
- Suzuki T, Mihara K, Nakamura A, Kagawa S, Nagai G, Nemoto K, et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP3A5, and ABCB1 on the steady-state plasma concentrations of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in Japanese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit*. 2014 Oct;36(5):651-5.
- Swainston Harrison T, Perry CM. Aripiprazole: a review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Drugs*. 2004;64(15):1715-36.
- Tadori Y, Forbes RA, McQuade RD, Kikuchi T. In vitro pharmacology of aripiprazole, its metabolite and experimental dopamine partial agonists at human dopamine D2 and D3 receptors. *Eur J Pharmacol*. 2011 Oct 15;668(3):355-65.
- Tamminga CA, Carlsson A. Partial dopamine agonists and dopaminergic stabilizers, in the treatment of psychosis. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2002 Apr;1(2):141-7.
- Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, et al. D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics*. 1997 Dec;7(6):479-84.
- Ujike H, Nomura A, Morita Y, Morio A, Okahisa Y, Kotaka T, et al. Multiple genetic factors in olanzapine-induced weight gain in schizophrenia patients: a cohort study. *J Clin Psychiatry*. 2008 Sep;69(9):1416-22.
- van der Weide K, van der Weide J. The influence of the CYP3A4\*22 polymorphism on serum concentration of quetiapine in psychiatric patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2014 Apr;34(2):256-60.
- van der Weide K, van der Weide J. The Influence of the CYP3A4\*22 Polymorphism and CYP2D6 Polymorphisms on Serum Concentrations of Aripiprazole, Haloperidol, Pimozide, and Risperidone in Psychiatric Patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2015 Jun;35(3):228-36.
- van Noord C, Eijgelsheim M, Stricker BH. Drug- and non-drug-associated QT interval prolongation. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;70:16-23.

- Vehof J, Burger H, Wilffert B, Al Hadithy A, Alizadeh BZ, Snieder H; GROUP investigators.. Clinical response to antipsychotic drug treatment: association study of polymorphisms in six candidate genes. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2012 Sep;22(9):625-31.
- Vijayan NN, Mathew A, Balan S, Natarajan C, Nair CM, Allencherry PM, et al. Antipsychotic drug dosage and therapeutic response in schizophrenia is influenced by ABCB1 genotypes: a study from a south Indian perspective. *Pharmacogenomics*. 2012 Jul;13(10):1119-27.
- Yeo RK, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Abundance of cytochromes P450 in human liver: a meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57(5):687–8.
- Yu AM, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Küpfer A, Gonzalez FJ. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2003 Mar;13(3):173-81.
- Wang JS, Zhu HJ, Donovan JL, Yuan HJ, Markowitz JS, Geesey ME, et al. Aripiprazole brain concentration is altered in P-glycoprotein deficient mice. *Schizophr Res*. 2009 May;110(1-3):90-4.
- Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011 Aug;11(4):274-86.
- Weinberg, W., 1908 Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh. Ver. Vaterl. Naturkd. Württemb*. 64: 369–382.
- Weiss EL, Longhurst JG, Bowers MB Jr, Mazure CM. Olanzapine for treatment-refractory psychosis in patients responsive to, but intolerant of, clozapine. *J Clin Psychopharmacol*. 1999 Aug;19(4):378-80.
- Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, et al. Identification and characterization of CYP3A4\*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Apr;79(4):339-49.
- Wojnicz A, Belmonte C, Koller D, Ruiz-Nuño A, Román M, Ochoa D, et al. Effective phospholipids removing microelution-solid phase extraction LC-MS/MS method for simultaneous plasma quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole: Application to human pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Mar 20;151:116-125.
- Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of genetic polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: update of the literature. *Clin Pharmacokinet* 2015;54: 709–35.
- Wood MD, Scott C, Clarke K, Westaway J, Davies CH, Reavill C, et al. Aripiprazole and its human metabolite are partial agonists at the human dopamine D2 receptor, but the rodent metabolite displays antagonist properties. *Eur J Pharmacol*. 2006 Sep 28;546(1-3):88-94.
- Yasui-Furukori N, Fujii A. Worsened hypertension control induced by aripiprazole. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:505-7.
- Yoshimori M, Takada H, Imadome K, Kurata M, Yamamoto K, Koyama T, et al. P-glycoprotein is expressed and causes resistance to chemotherapy in EBV-positive T-cell lymphoproliferative diseases. *Cancer Med*. 2015 Oct;4(10):1494-504.
- Young RM, Lawford BR, Barnes M, Burton SC, Ritchie T, Ward WK, et al. Prolactin levels in antipsychotic treatment of patients with schizophrenia carrying the DRD2\*A1 allele. *Br J Psychiatry*. 2004 Aug;185:147-5.
- Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2004 Jan;369(1):23-37.

- Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013 Apr;138(1):103-41.
- Zhang L, Ma W, Barker JL, Rubinow DR. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. *Neuroscience.* 1999;94(1):251-9.
- Zhou SF, Di YM, Chan E, Du YM, Chow VD, Xue CC, et al. Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab.* 2008 Oct;9(8):738-84. (A).
- Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica.* 2008 Jul;38(7-8):802-32. (B).
- Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(11):689-723.
- Zwisler ST, Enggaard TP, Mikkelsen S, Verstuyft C, Becquemont L, Sindrup SH, et al. Lack of association of OPRM1 and ABCB1 single-nucleotide polymorphisms to oxycodone response in postoperative pain. *J Clin Pharmacol.* 2012 Feb;52(2):234-42.

**Direcciones electrónicas:**

<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>

<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>

<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2D6>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>

<http://www.omim.org/entry/124010>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>

<https://www.pharmgkb.org/gene/PA131?tabType=tabVip>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5>

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000085563;r=7:87503633-87713323](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000085563;r=7:87503633-87713323)

[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000149295;r=11:113409615-113475691](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000149295;r=11:113409615-113475691)

<http://www.internationalgenome.org>





## PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

**Artículo 1:** Evaluation of the Relationship Between Pharmacokinetics and the Safety of Aripiprazole and Its Cardiovascular Effects in Healthy Volunteers.

**Autores:** Belmonte C, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T, Talegón M, Sánchez-Rojas SD, Abad-Santos F.

**J Clin Psychopharmacol. 2016 Dec;36(6):608-614.**

# Evaluation of the Relationship Between Pharmacokinetics and the Safety of Aripiprazole and Its Cardiovascular Effects in Healthy Volunteers

Carmen Belmonte, MSc,\* Dolores Ochoa, MD, PhD,\* Manuel Román, MLT,\* Teresa Cabaleiro, PhD,\* Maria Talegón, MLT,\* Sergio Daniel Sánchez-Rojas, MD,\* and Francisco Abad-Santos, MD, PhD\*†

**Aims:** The aim of this study was the evaluation of the possible relationship between pharmacokinetics and the safety of aripiprazole as well as its influence on blood pressure (BP), heart rate (HR), and corrected QT (QTc) interval.

**Methods:** The study population comprised 157 healthy volunteers from 6 bioequivalence clinical trials. Subjects were administered a single 10-mg oral dose of each formulation separated by a 28-day washout period. Plasma concentrations were measured using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Blood pressure was measured at the following times: predose and 0.5, 2, 4, 6, and 8 hours postdose. An electrocardiogram was recorded at predose, 4, and 8 hours postdose.

**Results:** Area under the curve (AUC), maximum plasma concentration, half-life, and distribution volume corrected for weight were higher in women. Aripiprazole treatment produced a decrease of BP (9.3 mm Hg on systolic and 6.2 mm Hg on diastolic pressure) and an increase in HR (12.1 beats per minute) and QTc interval (9.1 milliseconds). There were sex differences in BP, HR, and QTc interval. Women and subjects with higher AUC and maximum plasma concentration values were more prone to experience adverse drug reactions and gastrointestinal adverse reactions. The AUC was related with systolic BP and diastolic BP decrease and HR increase but there was no relationship between aripiprazole concentrations and QTc increase.

**Conclusions:** Aripiprazole decreases BP and increases HR and QTc interval. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of aripiprazole are affected by sex. There is a directly proportional relationship between pharmacokinetic parameters and adverse drug reactions and effect on BP and HR.

**Key Words:** aripiprazole, pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety

(*J Clin Psychopharmacol* 2016;36: 608–614)

Aripiprazole is an atypical antipsychotic indicated for the treatment of schizophrenia and manic or mixed episodes associated with bipolar I disorder. The recommended dose for patients with schizophrenia is 10 to 15 mg/d and for patients with manic episodes is 15 mg/d.<sup>1,2</sup>

Because of its mechanism of action, aripiprazole belongs to a new generation of antipsychotics called *third-generation* antipsychotics.<sup>3</sup> It acts as a partial agonist of the dopamine D<sub>2</sub>, dopamine D<sub>3</sub>, and serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors and as an antagonist of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors.<sup>4–7</sup> In addition, it exhibits a moderate affinity for  $\alpha_1$  adrenergic and histamine H<sub>1</sub> receptors.<sup>8,9</sup>

Aripiprazole has a linear pharmacokinetic within the dose ranges of 5 to 30 mg/d.<sup>10</sup> It is metabolized by the liver by dehydrogenation

(CYP2D6), hydroxylation (CYP2D6), and N-dealkylation (CYP3A isozymes). It has an active metabolite, dehydro-aripiprazole, representing approximately 40% of aripiprazole area under the curve (AUC) in plasma at steady state. Dehydro-aripiprazole has an affinity for dopamine D<sub>2</sub> receptors similar to aripiprazole.<sup>11</sup> The peak plasma concentration of aripiprazole occurs within 3 to 5 hours postdose. The mean volume of distribution at steady state is 4.9 L/kg. Half-life ( $T_{1/2}$ ) of aripiprazole is 75 hours for CYP2D6 extensive metabolizers and 146 hours for poor metabolizers, whereas for dehydro-aripiprazole, it is approximately 94 hours.<sup>1</sup> Aripiprazole and its metabolite are widely bound to plasma proteins, primarily to albumin.<sup>12</sup>

According to drug label,<sup>1</sup> most common adverse drug reactions (ADRs) to aripiprazole are akathisia and nausea with an incidence of 3% among patients. Other ADRs produced by aripiprazole are agitation, insomnia, anxiety, extrapyramidal disorders, somnolence, headache, blurred vision, vomiting, constipation, fatigue, tachycardia, and postural hypotension.<sup>1</sup>

In general, aripiprazole has a better safety profile than other atypical antipsychotics; it has a lower rate of extrapyramidal symptoms, weight gain, or hyperprolactinemia.<sup>10</sup>

The role of aripiprazole on corrected QT (QTc) prolongation is contradictory. Even though aripiprazole is thought not to affect QTc interval,<sup>13,14</sup> several cases of long QTc after aripiprazole treatment have been described.<sup>15,16</sup> Furthermore, there is no “Thorough QT/QTc Study” (a study to determine if a drug can prolong QTc) of aripiprazole available in the literature.

Several studies have shown that it is less likely to produce long QT syndrome<sup>10</sup> than other antipsychotics like pimozide,<sup>17</sup> haloperidol, ziprasidone, and clozapine.<sup>18,19</sup>

Moreover, evidence of its effects on heart rate (HR) and blood pressure (BP) remains unclear.<sup>12,20</sup>

Our aim was to evaluate the relationship between pharmacokinetics and safety profile of aripiprazole and also to study its influence on the electrocardiogram (ECG) and the BP in healthy subjects receiving a single dose.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

One hundred fifty-seven healthy volunteers (89 men and 68 women) were enrolled in 6 bioequivalence clinical trials performed at the Clinical Trial Unit of Hospital Universitario de la Princesa. These trials were conducted after approval by the Research Ethics Committee of Hospital de la Princesa (Madrid, Spain), duly authorized by the Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios and under the guidelines of good clinical practice. All the volunteers gave written informed consent for the study.

Subjects who fulfilled all of the inclusion criteria and none of the exclusion criteria were included in the study. The inclusion criteria were as follows: aged 18 to 55 years, subjects free from any organic or psychic conditions, normal vital signs and ECG,

From the \*Service of Clinical Pharmacology, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa; and †Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Received April 1, 2016; accepted after revision August 12, 2016.

Reprints: Francisco Abad-Santos, MD, PhD, Service of Clinical Pharmacology, Hospital Universitario de la Princesa, Diego de León 62. 28006 Madrid, Spain (e-mail: francisco.abad@salud.madrid.org).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0271-0749

DOI: 10.1097/JCP.0000000000000577



and no clinically significant abnormalities in hematology, biochemistry, serology, and urine test. Exclusion criteria were as follows: subjects who have received prescribed pharmacological treatment in the last 15 days or any kind of medication in the 48 hours before receiving the study medication, body mass index (BMI) outside the 18.5 to 30.0 range, smokers, history of sensitivity to any drug, pregnant women, or lactose intolerance.

### Study Design and Procedures

All the clinical trials were phase I, oral single dose, randomized, open-label, 2 periods, 2 sequences, crossover, single-center studies with blind determination of the plasma concentrations of aripiprazole by the responsible analyst. In half of the trials, the volunteers received aripiprazole 10 mg tablets, whereas in the other half, the volunteers received aripiprazole 10 mg orodispersible tablets. In the first period, each volunteer received a single dose of 1 formulation of aripiprazole (test or reference). In the second period, after a washout period of 28 days, each volunteer received the same dose of the other formulation. Volunteers fasted from 10 hours before until 5 hours after drug administration. For tablets, each administration was with at least 240 mL (8 oz) of water and for orodispersible tablets, before drug administration, volunteers rinsed their mouth with 20 mL of water. In all the studies, the reference formulation was Abilify (Otsuka Pharmaceutical Laboratories Europe, London, United Kingdom).

Blood samples were collected in 6-mL sterile EDTA-K2 tubes. Samples were centrifuged at 3500 rpm (1900g) for 10 minutes and then plasma was collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until its shipment to the accredited external laboratory that determined plasma concentrations of aripiprazole. These concentrations were measured by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry detector with a lower limit of quantification of 0.5 ng/mL. The method involved solid-phase extraction procedure with strong cation exchange and reversed-phase 10-mg plates. Chromatographic separations were performed on a reversed-phase column (Zorbax SB-C18,  $4.6 \times 50$  mm,  $3.5 \mu\text{m}$ , from Agilent Technologies Santa Clara, CA). The mobile phase was ammonium formate 1 mM, 0.1% formic acid prepared in Milli-Q, Merck Millipore (Billerica, MA) water: methanol (42:58 v/v). The chromatographic separation was isocratically performed at room temperature at a flow rate of 1.00 mL/min.

### Pharmacodynamic Analysis

Blood pressure was measured supine using an automatic monitor at predose, 0.5, 2, 4, 6, and 8 hours after dosing. In addition, a 12-lead ECG was obtained at predose, 4, and 8 hours postdose. Because the QT interval has an inverse relationship to HR, it might be corrected for HR; for this purpose, we used the Bazett correction formula.<sup>21</sup> According to the International Council for Harmonisation E14 clinical guidance,<sup>22</sup> we considered QTc interval prolongation an absolute QTc interval greater than 450 milliseconds or a change from baseline in QTc interval greater than 30 milliseconds.

### Pharmacokinetic Analysis

Pharmacokinetic parameters were estimated by noncompartmental analysis using WinNonlin Professional, version 2.0. (Pharsight Corporation Cary, NC). The maximum plasma concentration ( $C_{\text{max}}$ ) and time to reach the maximum plasma concentration ( $T_{\text{max}}$ ) were obtained directly from raw data. The total AUC from administration to infinity ( $\text{AUC}_{0-\infty}$ ) was calculated as the sum of  $\text{AUC}_{0-t}$  and the residual area ( $C_t$  divided by  $k_e$ , with  $C_t$  as the last measured concentration and  $k_e$  as the apparent terminal elimination rate, which was estimated by log-linear regression from the terminal portion of

the log-transformed concentration-time plots). Half-life was calculated by dividing 0.693 by  $k_e$ .

The total drug clearance adjusted for bioavailability was calculated by dividing the dose by the  $\text{AUC}_{0-\infty}$  and adjusting for weight. The AUC and  $C_{\text{max}}$  were adjusted for dose and weight and logarithmically transformed for statistical analysis.

### Safety and Tolerability Assessments

The safety and tolerability of aripiprazole was assessed by clinical evaluation of adverse events (AEs) and other parameters including vital signs, physical examinations, and 12-lead ECGs. During the development of the study, volunteers were asked if they had experienced any AE and, in addition, those AEs spontaneously notified by the volunteer were recorded. Karch and Lasagna<sup>23</sup> criteria were used to determine causality. On the basis of these criteria, AEs can be classified as definite, probable, possible, unlikely, and unrelated. Only those AEs that were definite, probable, or possible were considered as ADRs and taken into account for the statistical analysis. Intensity (mild, moderate, and severe), time sequence, and outcome of AEs were also recorded.

According to the drug label,<sup>1</sup> ADRs were classified using *system organ class* allocation as general (asthenia, back pain), cardiovascular (hypotension, QTc prolongation, syncope, and tachycardia), gastrointestinal (gastroenteritis, nausea/vomiting, and abdominal pain), genitourinary (polyuria), neurological (dizziness, headache, hiccups, and somnolence), psychiatric (nightmares, insomnia, and nervousness), and respiratory (shortness of breath).

### Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS 15.0 software (SPSS Inc, Chicago, Ill);  $P$  values less than 0.05 were considered statistically significant. We have analyzed the data of both formulations (reference and test formulations of tablets and orodispersible tablets) together because of the fact that they have proven to be bioequivalent.

For the statistical analysis of pharmacokinetics and ADRs, we have considered data from each period separately. For the statistical analysis of the ADRs, it was only considered whether an ADR had developed, not including the number of times that this ADR took place. Pharmacokinetic data were logarithmically transformed for data analysis, except  $T_{\text{max}}$ , in accordance with European Medicines Agency guidelines.<sup>24</sup> The corrected Pearson  $\chi^2$  test was applied to compare the incidence of ADRs between men and women and between age groups (older or younger than 30 years). In addition, we determined the influence of the pharmacokinetics on ADRs using  $t$  test. We used the same test to study if pharmacokinetics parameters differ between age groups. We perform a logistic regression to study the influence of age and sex in the development of ADRs. Furthermore, to study the capacity of AUC and  $C_{\text{max}}$  to discriminate patients with ADRs and nausea/vomiting, receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted and sensitivity and specificity computed.

We evaluated whether sex had influence on pharmacokinetics and pharmacodynamic parameters (systolic blood pressure [SBP], diastolic blood pressure [DBP], QTc and HR) using  $t$  test. The correlation between AUC,  $C_{\text{max}}$ , and concentration of aripiprazole (at 4 and 8 hours) and decrease in BP and increase in QTc and HR was analyzed by lineal regression.

## RESULTS

### Demographic Characteristics

We analyzed 157 healthy volunteers (89 men and 68 women). Demographic data are shown in Table 1. Average age was similar

**TABLE 1.** Baseline Demographic Characteristics of the Volunteers

|       | N (%)     | Age (y)    | Weight (kg) | Height (m)   | BMI (kg/m <sup>2</sup> ) |
|-------|-----------|------------|-------------|--------------|--------------------------|
| All   | 157 (100) | 26.1 (7.5) | 70.0 (11.7) | 1.71 (0.09)  | 23.9 (2.9)               |
| Men   | 89 (56.7) | 25.1 (6.4) | 75.1 (9.7)  | 1.76 (0.07)  | 24.5 (2.6)               |
| Women | 68 (43.3) | 27.5 (8.6) | 62.6 (9.7)* | 1.64 (0.06)* | 23.1 (3.1) <sup>†</sup>  |

Values are mean (SD) unless otherwise indicated.

<sup>†</sup> $P \leq 0.01$  and  $*P \leq 0.001$  versus men.

between men and women. However, men had a greater weight, height, and BMI than women.

There were volunteers who participated in more than 1 clinical trial: 1 subject participated in 4, 1 subject participated in 3, and 17 subjects participated in 2 clinical trials. One hundred twenty-one subjects participated in only 1 clinical trial. There were 17 subjects who completed only 1 period.

### Pharmacokinetic Analysis

Mean and standard deviation (SD) of pharmacokinetic parameters are included in Table 2. We found statistically significant differences between men and women in some pharmacokinetic parameters even after adjusting for weight. The AUC,  $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$ , and distribution volume corrected for weight ( $V_d/W$ ) were higher in women as Table 2 shows. In addition, we analyzed if there was a relationship between subject withdrawal and higher values of AUC and  $C_{max}$ . Volunteers who dropped out because of vomiting (after administration) or other ADRs ( $N = 11$ ) showed a tendency in having higher values of AUC (1759.3 [658.5] ng·h/mL vs 1605.2 [412.1] ng·h/mL;  $P = 0.988$ ) and  $C_{max}$  (56.4 [17.4] ng/mL vs 48.3 [10.5] ng/mL;  $P = 0.068$ ) than those volunteers who did not leave the study or those who left the study for personal reasons ( $N = 146$ ). However, these findings were not statistically significant. Volunteers older than 30 years had higher levels of  $T_{1/2}$  (62.2 [28.3] vs 50.3 [21.6];  $P = 0.044$ ) and  $V_d/W$  (4.6 [0.8] vs 4.1 [0.9];  $P = 0.004$ ) compared with those younger than 30 years, but there were no differences in AUC and  $C_{max}$ .

### Pharmacodynamics

As Table 3 shows, aripiprazole has a BP-lowering effect: SBP decreased a maximum mean of 9.3 mm Hg and DBP decreased a mean of 6.2 mm Hg. There was a significant inverse relationship between AUC and SBP (nonstandardized  $\beta$  coefficient =  $-0.005$ ;  $P = 0.005$ ) and DBP (nonstandardized  $\beta$  coefficient =  $-0.002$ ;  $P = 0.012$ ). Similarly, there was a statistically significant increase in HR at 4 hours (4.5 beats per minute [bpm];  $P = 0.001$ ) and even higher at 8 hours (12.1 bpm;  $P < 0.001$ ) compared with predose value. We found a directly proportional relationship between AUC and HR (nonstandardized  $\beta$  coefficient =  $0.005$ ;  $P =$

0.024). We did not find a relationship between  $C_{max}$  and SBP, DBP, and HR.

There was a 9.1-millisecond increase in QTc interval from baseline to 4 and 8 hours postdose (Table 3). Following European Medicines Agency criteria,<sup>22</sup> at 4 hours postdose, there were 18 volunteers with long QTc and at 8 hours postdose, there were 24 volunteers with long QTc. A QTc interval prolongation greater than 500 milliseconds or an increase from baseline greater than 60 milliseconds is considered an increased risk of Torsade de Pointes.<sup>25,26</sup> There were 3 subjects in whom increase of QTc from baseline was greater than 60 milliseconds. In our study, aripiprazole plasmatic concentrations were not related to increase in QTc interval at 4 hours (nonstandardized  $\beta$  coefficient =  $0.239$ ;  $P = 0.265$ ) or 8 hours postdose (nonstandardized  $\beta$  coefficient =  $0.247$ ;  $P = 0.329$ ). There was also no relationship between long QTc interval and higher concentrations of aripiprazole at the time of ECG, AUC, and  $C_{max}$  values.

In relation to sex, there were significant differences in SBP, DBP, QTc, and HR at all measured times. Blood pressure was higher in men than in women, whereas HR and QTc interval were higher in women than in men as Table 3 shows. However, the pharmacodynamic effect of aripiprazole was similar in men and women.

### Adverse Drug Reactions

During the course of the study, there were no severe, serious, or life-threatening AEs. Nineteen volunteers (12.1%, 14 women and 5 men) dropped out of the study for different reasons including vomiting within 2 hours after drug administration (47.4%), personal reasons (42.1%), or other ADRs (10.5%). In these cases, only pharmacokinetic parameters of the first period were considered. Study withdrawal was associated with sex, with a dropout rate higher in women than in men (20.6% vs 5.6%;  $P = 0.006$ ).

A total of 108 volunteers (68.8%) experienced at least one ADR, being the most frequently reported: dizziness (38.9%), nausea/vomiting (29.9%) and headache (18.5%). Using system organ class allocation, the most frequent were neurological (51.0%) and gastrointestinal ADRs (31.8%).

In general, ADR incidence was greater among women (77.9% vs 61.8% in men;  $P = 0.037$ ). Particularly, gastrointestinal

**TABLE 2.** Pharmacokinetic Parameters of Aripiprazole After a Single Oral Dose of 10 mg

| Pharmacokinetic Parameters | All            | Men            | Women                    |
|----------------------------|----------------|----------------|--------------------------|
| AUC (ng·h/mL)              | 1616.0 (432.7) | 1552.7 (396.2) | 1698.9 (466.3)*          |
| $C_{max}$ (ng/mL)          | 48.8 (11.2)    | 46.5 (9.8)     | 51.9 (12.3)*             |
| $T_{max}$ (h)              | 3.2 (1.7)      | 3.0 (1.6)      | 3.4 (1.7)                |
| $T_{1/2}$ (h)              | 52.6 (23.4)    | 46.9 (16.4)    | 60.0 (28.7) <sup>†</sup> |
| $V_d/W$ (L/kg)             | 4.2 (0.9)      | 3.9 (0.7)      | 4.6 (0.9) <sup>†</sup>   |
| CL/W (mL/h·kg)             | 63.6 (23.1)    | 64.3 (19.5)    | 62.7 (27.1)              |

\* $P \leq 0.05$  and <sup>†</sup> $P \leq 0.001$  versus men after adjusting for weight.

**TABLE 3.** Effects of Aripiprazole on SBP, DBP, HR, and QTc Interval

|                      | Sex   | Predose                   | Postdose                  |                           |                            |                           |                            |
|----------------------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                      |       |                           | 0.5 h                     | 2 h                       | 4 h                        | 6 h                       | 8 h                        |
| SBP (mm Hg)          | Men   | 120.5 (10.1)              | 114.1 (8.5)*              | 111.9 (10.5)*             | 113.8 (8.8)*               | 116.6 (9.5)               | 116.3 (8.9) <sup>†</sup>   |
|                      | Women | 111.3 (10.0) <sup>§</sup> | 105.3 (9.3) <sup>‡§</sup> | 101.0 (8.7)* <sup>§</sup> | 104.0 (8.0)* <sup>§</sup>  | 105.1 (8.5)* <sup>§</sup> | 105.2 (9.0)* <sup>§</sup>  |
|                      | Total | 116.5 (11.0)              | 110.3 (9.8)*              | 107.2 (11.1)*             | 109.6 (9.8)*               | 111.6 (10.7)*             | 111.5 (10.5)*              |
| DBP (mm Hg)          | Men   | 66.6 (7.4)                | 64.0 (6.8)                | 60.4 (7.1)*               | 60.8 (6.2)*                | 60.0 (5.5)*               | 60.3 (5.6)*                |
|                      | Women | 62.8 (6.4) <sup>§</sup>   | 60.3 (5.5) <sup>§</sup>   | 57.0 (5.5) <sup>  </sup>  | 57.8 (4.7)* <sup>§</sup>   | 57.2 (4.0) <sup>§</sup>   | 57.4 (4.3)* <sup>§</sup>   |
|                      | Total | 65.0 (7.2)                | 62.4 (6.5) <sup>‡</sup>   | 58.9 (6.7)*               | 59.5 (5.8)*                | 58.8 (5.1)*               | 59.0 (5.3)*                |
| HR (bpm)             | Men   | 60.6 (9.7)                |                           |                           | 64.9 (10.2) <sup>†</sup>   |                           | 72.9 (11.8)*               |
|                      | Women | 66.0 (10.0) <sup>§</sup>  |                           |                           | 70.6 (11.3) <sup>†§</sup>  |                           | 77.9 (11.2)* <sup>§</sup>  |
|                      | Total | 62.9 (10.0)               |                           |                           | 67.4 (11.0)*               |                           | 75.0 (11.8)*               |
| QT <sub>C</sub> (ms) | Men   | 392.5 (16.8)              |                           |                           | 400.9 (21.1) <sup>†</sup>  |                           | 401.5 (21.6) <sup>‡</sup>  |
|                      | Women | 410.0 (16.9) <sup>§</sup> |                           |                           | 420.0 (24.9) <sup>†§</sup> |                           | 419.4 (21.5) <sup>†§</sup> |
|                      | Total | 400.1 (18.9)              |                           |                           | 409.2 (24.6)*              |                           | 409.2 (23.3)*              |

Values are mean (SD).

<sup>†</sup> $P \leq 0.05$ , <sup>‡</sup> $P \leq 0.01$ , and <sup>\*</sup> $P \leq 0.001$  compared with predose. <sup>||</sup> $P \leq 0.01$ , and <sup>§</sup> $P \leq 0.001$  compared with men, at the same time.

ADRs were more frequent in women than in men (45.6% vs 21.3%;  $P = 0.002$ ), including nausea/vomiting (42.6% vs 20.2%;  $P = 0.003$ ).

Our results demonstrate a significant association between pharmacokinetics and ADRs. Volunteers who experienced at least 1 ADR or gastrointestinal ADRs had higher AUC and  $C_{\max}$  values than those who did not, as shown in Table 4. In addition, we found higher AUC and  $C_{\max}$  values in volunteers who experienced nausea/vomiting, but these results were only statistically significant for  $C_{\max}$  (Table 4).

To establish the best cutoff to discriminate volunteers in risk of ADRs from AUC and  $C_{\max}$  values, ROC curves were plotted (Fig. 1). Area under ROC curve was significantly higher than 0.5 ( $P < 0.001$  in both); AUC, 0.631 (95% confidence interval [CI], 0.572–0.691) and  $C_{\max}$ , 0.613 (95% CI, 0.553–0.673). The best cutoff for AUC was 1570.3 ng·h/mL (sensitivity, 55.8%; specificity, 70.3%) and for  $C_{\max}$ , 55.61 ng/mL (sensitivity, 36.8%; specificity, 82.3%). In multivariate logistic regression models, age was not significantly associated to ADRs. Because nausea/vomiting was more frequent in women (odds ratio, 2.789 [95% CI, 1.510–5.154]), cutoff was studied separately for men and women. Area under ROC curve to predict nausea/vomiting from AUC and  $C_{\max}$  values was significantly higher than 0.5 for men ( $P = 0.010$  and  $P = 0.002$ , respectively); AUC was 0.680 (95% CI, 0.549–0.812) and  $C_{\max}$  was 0.721 (95% CI, 0.617–0.825), but area under ROC curve was not significantly higher than 0.5 for women (AUC,  $P = 0.460$

and  $C_{\max}$ ,  $P = 0.687$ ). For men, the best cutoff for AUC was 1688.9 ng·h/mL (sensitivity, 68.4%; specificity, 75.8%) and for  $C_{\max}$ , the best cutoff was 43.88 ng/mL (sensitivity, 94.7%; specificity, 51.6%).

The percentage of subjects with ADRs did not differ statistically between younger ( $\leq 30$  years) (70.1%) and older ( $> 30$  years) volunteers (63.3%) ( $P = 0.514$ ).

## DISCUSSION

### Sex Influence on Pharmacokinetics

The pharmacokinetic parameters obtained in our study are similar to those published in the literature<sup>27,28</sup> and shown in the drug label.<sup>1</sup> Sex differences were observed in the pharmacokinetics of aripiprazole. The AUC,  $C_{\max}$ ,  $T_{1/2}$ , and  $V_d/W$  were higher in women than in men. These results are consistent with information in the drug label,<sup>1</sup> which states that “ $C_{\max}$  and AUC of aripiprazole are 30% to 40% higher in women than in men. These differences, however, are largely explained by differences in body weight (25%) between men and women”. However, we found statistically significant differences after adjusting all the parameters for weight.

The influence of sex on drug pharmacokinetics is a quite well-known aspect. There are different factors causing these differences such as hormonal changes and differences in body weight.<sup>29,30</sup> Women present a higher  $V_d/W$  than men because of

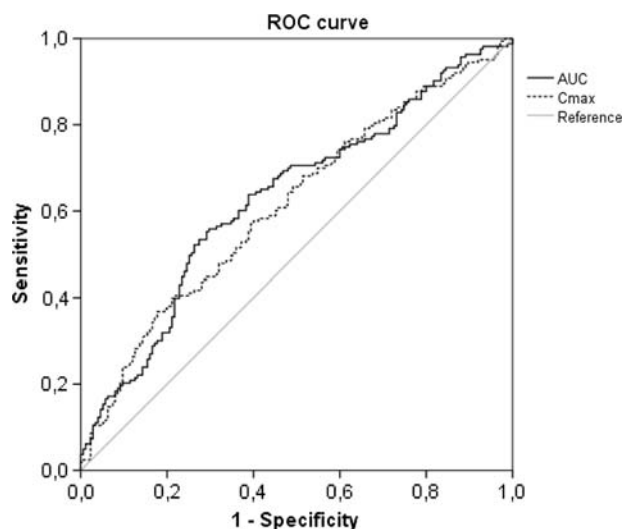
**TABLE 4.** Association Between Pharmacokinetic Parameters (AUC and  $C_{\max}$ ) and ADRs

|                            |     | N (%)      | AUC (ng·h/mL)               | $C_{\max}$ (ng/mL)       |
|----------------------------|-----|------------|-----------------------------|--------------------------|
| ADRs                       | No  | 175 (51.8) | 1495.2 (365.0)              | 46.6 (11.3)              |
|                            | Yes | 163 (48.2) | 1677.9 (453.0)*             | 51.5 (13.1)*             |
| Nausea/vomiting            | No  | 280 (82.8) | 1561.3 (412.8)              | 48.0 (12.4)              |
|                            | Yes | 58 (17.2)  | 1689.2 (437.5)              | 53.4 (12.0) <sup>†</sup> |
| Gastrointestinal reactions | No  | 277 (82.0) | 1553.8 (408.3)              | 47.8 (12.2)              |
|                            | Yes | 61 (18.0)  | 1717.1 (445.4) <sup>†</sup> | 53.9 (12.3)*             |

Values are mean (SD) unless otherwise indicated.

<sup>†</sup> $P \leq 0.05$  and <sup>\*</sup> $P \leq 0.001$  versus “No”

N indicates number of drug administrations.



**FIGURE 1.** The ROC curves for AUC and  $C_{\max}$  to discriminate subjects with ADRs.

their higher fat percentage.<sup>30</sup> These findings are discrepant with a previous study analyzing different antipsychotics in which differences between sex and plasmatic concentrations were only found with clozapine and olanzapine but not with aripiprazole.<sup>31</sup> Moreover, other studies did not find influence of sex on plasma concentration of aripiprazole.<sup>32,33</sup> These different results could be explained by the differences in study design (these clinical trials are multiple dose, whereas our study is single dose).

### Pharmacodynamics

In our study, aripiprazole increased HR and decreased BP. These results are consistent with other studies in which aripiprazole increased HR from baseline (mean increase of 4 bpm vs 1 bpm after placebo). This could be due to a compensatory response to a decrease in BP.<sup>34</sup> Orthostatic hypotension is a known adverse effect of many antipsychotic drugs, although some cases of hypertension after aripiprazole treatment have been described.<sup>35,36</sup>

The QTc prolongation is a known risk factor of sudden death. Many studies have reported the effect of antipsychotics on QTc prolongation,<sup>37,38</sup> the most common being thioridazine (withdrawn from the Spanish market in 2005) and ziprasidone.<sup>39</sup> The effect of aripiprazole on the QTc interval in ECGs remains unclear. We described an increase in QTc interval after the administration of aripiprazole. In a study with psychiatric patients, the QTc interval decreased 6.94 milliseconds from baseline to the end of treatment.<sup>40</sup> Another study reported a reduction in QTc with aripiprazole.<sup>41</sup> However, in a recently controlled crossover study for 90 drugs with 59,467 subjects,<sup>42</sup> aripiprazole showed a mean QTc prolongation of 7.6 milliseconds that is similar to our data. In addition, Torsade de Pointes (a form of ventricular tachycardia) was reported in a patient without history of cardiovascular risk after administration of 2.5 mg of aripiprazole.<sup>43</sup> This is the first study to demonstrate a relationship between AUC of aripiprazole and change in SBP, DBP, and HR. Surprisingly, it was not related to QTc prolongation, maybe, because it also depends on the concentrations of the active metabolite.

### Sex Influence on Pharmacodynamics

Differences in BP and ECG regarding sex are well known.<sup>44-47</sup> Longer QTc in women may be due to genetic or hormonal differences.<sup>48</sup> In a study performed in psychiatric patients with

4 antipsychotics (including aripiprazole), sex differences in QTc interval were observed only with olanzapine.<sup>49</sup> In another study performed in psychiatric patients and healthy volunteers,<sup>50</sup> a sex effect in the QT interval in healthy volunteers was reported, but not in the case of patients. These results agree with those found in our population, where healthy female volunteers had higher QTc values than men, but the effect of aripiprazole was similar in both groups.

### Adverse Drug Reactions

Several studies have reported the influence of sex on ADRs.<sup>51-53</sup> These differences might be related with differences in the exposure of women and men to drugs.<sup>53,54</sup> Indeed, in our study, the AUC and  $C_{\max}$  values were higher in women.

There are few published studies that examine the influence of pharmacokinetics on the safety of aripiprazole. A previous study<sup>10</sup> showed that there is no relationship between ADRs and pharmacokinetic parameters of aripiprazole. However, in a review,<sup>55</sup> there seems to be a correlation between aripiprazole plasma levels and  $D_2/D_3$  receptor occupancy. Greater values of AUC and  $C_{\max}$  could lead to a greater  $D_2/D_3$  receptor occupancy and, therefore, to a greater percentage of ADRs. In addition, in this review, 2 ranges of aripiprazole levels were described for ADRs. In the first one (110–249 ng/mL), ADRs were mild or absent. In the other one (210–335 ng/mL), the ADRs ranged from moderate to severe. These findings are similar to our results that show a relationship between AUC and  $C_{\max}$  and ADRs/gastrointestinal reactions.

### Study Limitations

Our study includes 6 single-dose bioequivalence clinical trials with healthy volunteers. The main limitation of our study is the impossibility to evaluate neither the efficacy of the drug nor the chronic ADRs (extrapyramidal symptoms, weight gain, or diabetes). In addition, *CYP2D6* genotyping was not performed, but it is not relevant for evaluating the relationship between concentrations and adverse reactions. On the contrary, our study allows controlling typical confounding factors of studies performed on psychiatric patients such as pathologic characteristics of the disease, concomitant therapy, and the motivation of patients. It is important to take into account that these results must be interpreted with caution because pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability could be different in psychotic patients. Larger studies are needed to increase the statistical power of these results.

### CONCLUSIONS

Pharmacokinetic of aripiprazole is affected by sex. The AUC,  $C_{\max}$ ,  $T_{1/2}$ , and  $V_d/W$  are higher in women than in men. The ADRs were more common in women, specially nausea and vomiting. Subjects with higher values of AUC and  $C_{\max}$  are more likely to experience these ADRs. Aripiprazole lowers BP and raises HR and QTc interval. The AUC was related to decrease in BP and increase in HR, but not to QTc increase. Sex is an influential factor on BP and ECG parameters.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by Fundación Teófilo Hernando and Foundation for Biomedical Research at Hospital Universitario de La Princesa.

The authors thank the cooperation of the volunteers and the effort of the staff of the Clinical Trial Unit of Hospital Universitario de la Princesa.

## AUTHOR DISCLOSURE INFORMATION

*Drs Abad-Santos and Ochoa have been consultants or investigators in clinical trials sponsored by the following pharmaceutical companies: Abbott, Alter, Chemo, Cinfa, Farmalider, Ferrer, GlaxoSmithKline, Galenicum, Gilead, Janssen-Cilag, Kern, Normon, Novartis, Servier, Teva, and Zambon. The other authors declare no conflicts of interest.*

## REFERENCES

- Food and Drug Administration. Aripiprazole label (2014). Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/021436s038,021713s030,021729s022,021866s023lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021436s038,021713s030,021729s022,021866s023lbl.pdf). Accessed July 1, 2014.
- Dhillon S. Aripiprazole: a review of its use in the management of mania in adults with bipolar I disorder. *Drugs*. 2012;72:133–162.
- Sayyaparaju KK, Grunze H, Fountoulakis KN. When to start aripiprazole therapy in patients with bipolar mania. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;10:459–470.
- Burris KD, Molski TF, Xu C, et al. Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:381–389.
- Jordan S, Koprivica V, Chen R, et al. The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT1A recept. *Eur J Pharmacol*. 2002;441:137–140.
- Shapiro DA, Renock S, Arrington E, et al. Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:1400–1411.
- Rauly-Lestienne I, Boutet-Robinet E, Ailhaud MC, et al. Differential profile of typical, atypical and third generation antipsychotics at human 5-HT7a receptors coupled to adenylyl cyclase: detection of agonist and inverse agonist properties. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2007;376:93–105.
- Patteet L, Morrens M, Maudens KE, et al. Therapeutic drug monitoring of common antipsychotics. *Ther Drug Monit*. 2012;34:629–651.
- Goodnick PJ, Jerry JM. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother*. 2002;3:1773–1781.
- Mallikaarjun S, Salazar DE, Bramer SL. Pharmacokinetics, tolerability, and safety of aripiprazole following multiple oral dosing in normal healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2004;44:179–187.
- Swainston Harrison T, Perry CM. Aripiprazole: a review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Drugs*. 2004;64:1715–1736.
- Citrome L, Macher JP, Salazar DE, et al. Pharmacokinetics of aripiprazole and concomitant carbamazepine. *J Clin Psychopharmacol*. 2007;27:279–283.
- Polcwiartek C, Sneider B, Graff C, et al. The cardiac safety of aripiprazole treatment in patients at high risk for torsade: a systematic review with a meta-analytic approach. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232:3297–3308.
- Suzuki Y, Sugai T, Ono S, et al. Changes in the metabolic parameters and QTc interval after switching from olanzapine to aripiprazole in Japanese patients with stable schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 2011;31:526–528.
- Hategan A, Bourgeois JA. Aripiprazole-associated QTc prolongation in a geriatric patient. *J Clin Psychopharmacol*. 2014;34:766–768.
- Suzuki Y, Ono S, Fukui N, et al. Dose-dependent increase in the QTc interval in aripiprazole treatment after risperidone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;30:643–644.
- Gulisano M, Cali PV, Cavanna AE, et al. Cardiovascular safety of aripiprazole and pimozide in young patients with Tourette syndrome. *Neurol Sci*. 2011;32:1213–1217.
- Drici MD, Priori S. Cardiovascular risks of atypical antipsychotic drug treatment. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2007;16:882–890.
- Muench J, Hamer AM. Adverse effects of antipsychotic medications. *Am Fam Physician*. 2010;81:617–622.
- Marcus RN, Owen R, Kamen L, et al. A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescents with irritability associated with autistic disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2009;48:1110–1119.
- Bazett HC. An analysis of time relations of the electrocardiogram. *Heart*. 1920;7:353–370.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline E14 (2005). The clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs. Available at: <http://www.ich.org/cache/compot/276-254-1.html>. Accessed September 1, 2015.
- Karch FE, Lasagna L. Toward the operational identification of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther*. 1977;21:247–254.
- European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the investigation of bioequivalence. 2010. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf). Accessed May 1, 2015.
- Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med*. 2004;350:1013–1022.
- Shah RR. Drug-induced prolongation of the QT interval: regulatory dilemmas and implications for approval and labelling of a new chemical entity. *Fundam Clin Pharmacol*. 2002;16:147–156.
- Koue T, Kubo M, Funaki T, et al. Nonlinear mixed effects model analysis of the pharmacokinetics of aripiprazole in healthy Japanese males. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:2154–2158.
- Kubo M, Koue T, Maune H, et al. Pharmacokinetics of aripiprazole, a new antipsychotic, following oral dosing in healthy adult Japanese volunteers: influence of CYP2D6 polymorphism. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2007;22:358–366.
- Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic drugs: effect of sex. *CNS Spectr*. 2013;18:118–127.
- Schwartz JB. The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42:107–121.
- Aichhorn W, Whitworth AB, Weiss EM, et al. Second-generation antipsychotics: is there evidence for sex differences in pharmacokinetic and adverse effect profiles? *Drug Saf*. 2006;29:587–598.
- Molden E, Lunde H, Lunder N, et al. Pharmacokinetic variability of aripiprazole and the active metabolite dehydroaripiprazole in psychiatric patients. *Ther Drug Monit*. 2006;28:744–749.
- Bachmann CJ, Rieger-Gies A, Heinzel-Gutenbrunner M, et al. Large variability of aripiprazole and dehydroaripiprazole serum concentrations in adolescent patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit*. 2008;30:462–466.
- Food and Drug Administration. Drug approval package: Abilify (aripiprazole) tablets. Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2002/21-436\\_abilify.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2002/21-436_abilify.cfm). Accessed January 20, 2015.
- Borras L, Constant EL, Eytan A, et al. Hypertension and aripiprazole. *Am J Psychiatry*. 2005;162:2392.
- Yasui-Furukori N, Fujii A. Worsened hypertension control induced by aripiprazole. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:505–507.
- Haddad PM, Anderson IM. Antipsychotic-related QTc prolongation, torsade de pointes and sudden death. *Drugs*. 2002;62:1649–1671.
- van Noord C, Eijgelsheim M, Stricker BH. Drug- and non-drug-associated QT interval prolongation. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;70:16–23.
- Stöllberger C, Huber JO, Finsterer J. Antipsychotic drugs and QT prolongation. *Int Clin Psychopharmacol*. 2005;20:243–251.

40. Pigott TA, Carson WH, Saha AR, et al. Aripiprazole for the prevention of relapse in stabilized patients with chronic schizophrenia: a placebo-controlled 26-week study. *J Clin Psychiatry*. 2003;64:1048–1056.
41. Goodnick PJ, Jerry J, Parra F. Psychotropic drugs and the ECG: focus on the QTc interval. *Expert Opin Pharmacother*. 2002;3:479–498.
42. Iribarren C, Round AD, Peng JA, et al. Validation of a population-based method to assess drug-induced alterations in the QT interval: a self-controlled crossover study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013;22:1222–1232.
43. Nelson S, Leung JG. Torsades de pointes after administration of low-dose aripiprazole. *Ann Pharmacother*. 2013;47:e11.
44. Heffernan KS, Jae SY, Lee M, et al. Gender differences in QTc interval in young, trained individuals with lower spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2007;45:518–521.
45. Maranon R, Reckelhoff JF. Sex and gender differences in control of blood pressure. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125:311–318.
46. Olsen RB, Bruehl S, Nielsen CS, et al. Gender differences in blood pressure-related hypoalgesia in a general population: the Tromsø Study. *J Pain*. 2013;14:699–708.
47. Darpo B, Karnad DR, Badilini F, et al. Are women more susceptible than men to drug-induced QT prolongation? Concentration-QTc modelling in a phase 1 study with oral rac-sotalol. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;77:522–531.
48. Rabkin SW. Impact of age and sex on QT prolongation in patients receiving psychotropics. *Can J Psychiatry*. 2015;60:206–214.
49. Suzuki Y, Sugai T, Fukui N, et al. Sex differences in the effect of four second-generation antipsychotics on QTc interval in patients with schizophrenia. *Hum Psychopharmacol*. 2013;28:215–219.
50. Fujii K, Ozeki Y, Okayasu H, et al. QT is longer in drug-free patients with schizophrenia compared with age-matched healthy subjects. *PLoS One*. 2014;9:e98555.
51. Martin RM, Biswas PN, Freemantle SN, et al. Age and sex distribution of suspected adverse drug reactions to newly marketed drugs in general practice in England: analysis of 48 cohort studies. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;46:505–511.
52. Aichhorn W, Whitworth AB, Weiss EM, et al. Differences between men and women in side effects of second-generation antipsychotics. *Nervenarzt*. 2007;78:45–52.
53. Nicolson TJ, Mellor HR, Roberts RR. Gender differences in drug toxicity. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31:108–114.
54. Kashuba AD, Nafziger AN. Physiological changes during the menstrual cycle and their effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34:203–218.
55. Sparshatt A, Taylor D, Patel MX, et al. A systematic review of aripiprazole—dose, plasma concentration, receptor occupancy, and response: implications for therapeutic drug monitoring. *J Clin Psychiatry*. 2010;71:1447–1456.

**Artículo 2:** Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms on Pharmacokinetics and Safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers.

**Autores:** Belmonte C, Ochoa D, Román M, Saiz-Rodríguez M, Wojnicz A, Gómez-Sánchez CI, Martín-Vílchez S, Abad-Santos F.

**Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 Jun;122(6):596-605.**

# Influence of *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5* and *ABCB1* Polymorphisms on Pharmacokinetics and Safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers

Carmen Belmonte<sup>1,2</sup>, Dolores Ochoa<sup>1,2</sup>, Manuel Román<sup>1,2</sup>, Miriam Saiz-Rodríguez<sup>1</sup>, Aneta Wojnicz<sup>1</sup>, Clara Isabel Gómez-Sánchez<sup>3</sup>, Samuel Martín-Vílchez<sup>1</sup> and Francisco Abad-Santos<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain, <sup>2</sup>UICEC Hospital Universitario de la Princesa, Plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain, <sup>3</sup>Department of Genetics, IIS-Fundación Jiménez Díaz University Hospital (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain and <sup>4</sup>Center for Biomedical Research Network Hepatic and Liver diseases (CIBERredh) – Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

(Received 21 November 2017; Accepted 29 December 2017)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effect of polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 2D6, CYP3A4 and CYP3A5 enzymes and in P-glycoprotein (P-gp) on the pharmacokinetics and safety of aripiprazole and, its active metabolite, dehydro-aripiprazole, in 148 healthy volunteers from six bioequivalence trials receiving a single oral dose of aripiprazole. The plasma concentrations of both analytes were measured by LC-MS/MS. *CYP2D6* (\*3,\*4,\*5,\*6,\*7,\*9 and copy number variations), *CYP3A4* (\*20 and \*22), *CYP3A5*\*3 and C3435T, C1236T and G2677T/A in *ABCB1* gene were determined. As the number of active *CYP2D6* alleles decreased, AUC<sub>0–t</sub>, C<sub>max</sub> and t<sub>1/2</sub> of aripiprazole were higher and clearance of aripiprazole, AUC<sub>0–t</sub> of dehydro-aripiprazole and ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole were lower. AUC<sub>0–t</sub> of aripiprazole of poor metabolizer (PM) subjects was increased by 50% compared to extensive metabolizers (EM), and AUC<sub>0–t</sub> of dehydro-aripiprazole was decreased by 33%. *ABCB1* 1236TT subjects had a lower clearance of aripiprazole ( $p = 0.023$ ) and AUC<sub>0–t</sub> ( $p = 0.039$ ) and C<sub>max</sub> of dehydro-aripiprazole ( $p = 0.036$ ) compared to C/C. *CYP3A5*\*3/\*3 subjects had a 10% lower ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole than \*1/\*3 ( $p = 0.019$ ). Adverse drug reactions (ADRs) had a directly proportional relationship with AUC<sub>0–t</sub> of aripiprazole ( $p = 0.001$ ), especially nausea/vomiting, which were more common in women ( $p = 0.005$ ). Women and *CYP3A5*\*1/\*1 subjects showed more often dizziness ( $p = 0.034$ ;  $p = 0.009$ ). Pharmacokinetics of aripiprazole is affected by *CYP2D6* phenotype but also by sex and C1236T (*ABCB1* gene), while dehydro-aripiprazole pharmacokinetics is affected by *CYP2D6* and C1236T. The ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole was influenced by *CYP2D6* phenotype and *CYP3A5*\*3. Concentrations of aripiprazole, sex, *CYP3A5*\*3 and *CYP2D6* were involved in the development of ADRs.

Aripiprazole is an atypical antipsychotic indicated for the treatment of schizophrenia and manic or mixed episodes associated with bipolar I disorder [1]. Its mechanism of action differs from the rest of atypical antipsychotics; it acts as a partial agonist at the dopamine D<sub>2</sub>, dopamine D<sub>3</sub> and serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors and as an antagonist at the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors [2–4]. Furthermore, it exhibits a moderate affinity for  $\alpha$ 1 adrenergic and histamine H<sub>1</sub> receptors [5,6].

Aripiprazole is extensively metabolized in the liver by the cytochrome P450 (CYP) 2D6 and CYP3A4 by dehydrogenation, hydroxylation and N-dealkylation [7]. Its active metabolite, dehydro-aripiprazole, represents around 40% of the parent drug levels in plasma [8]. Dehydro-aripiprazole seems to have similar pharmacological properties to aripiprazole; some authors have even reported that it could be more powerful than the parent drug [9].

*CYP2D6* is a highly polymorphic gene with more than 150 allelic variants [10]. According to *CYP2D6* genotype, subjects can be classified in four phenotypes [11]: poor metabolizers

(PMs), intermediate metabolizers (IM), extensive metabolizers (EM) or ultra-rapid metabolizers (UM). It has been described that PMs are exposed to higher concentrations of aripiprazole and lower concentrations of dehydro-aripiprazole, its exposure to the total drug moieties being 60% higher than EMs [1]. For these reasons, a dose adjustment could be necessary for PMs [12].

The other enzyme involved in the metabolism of aripiprazole is CYP3A4. The *CYP3A4*\*20 polymorphism produces a non-functional protein that could lead to higher levels of drugs in subjects carrying *CYP3A4*\*20 alleles [13]. In spite of this, currently there are no studies focusing on the influence of *CYP3A4*\*20 on the pharmacokinetics of aripiprazole. Recently, a new allelic variant named *CYP3A4*\*22 has been described [14], and this variant produces an enzyme with a reduced activity that can affect the metabolism of antipsychotic drugs such as quetiapine [15].

Due to the similar substrate specificity between CYP3A4 and CYP3A5, some drugs metabolized by CYP3A4 are also metabolized by CYP3A5 [16] and their pharmacokinetics could be affected by CYP3A5 polymorphisms [17]. *CYP3A5*\*3, the most frequent non-functional variant of

Author for correspondence: Francisco Abad Santos, Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Diego de León 62, 28006 Madrid, Spain (e-mail francisco.abad@salud.madrid.org).



*CYP3A5*, produces a non-functional protein. Subjects with the *CYP3A5*\*3/\*3 genotype do not express *CYP3A5* [18,19], so it is expected that these subjects will have higher concentrations of aripiprazole.

Both aripiprazole and dehydro-aripiprazole are substrates of P-glycoprotein (P-gp) [20]. Gene *ABCB1* (ATP-binding cassette subfamily B 1) encodes P-gp that is involved in drug absorption, distribution and elimination [21,22]. C3435T SNP (rs1045642) in *ABCB1* is related to level of expression and function of *ABCB1*, and thereby drug plasma concentrations. However, results have not been very clarifying to date, while some authors affirm that subjects with T/T genotype could have less duodenal expression of *ABCB1* that could lead to higher levels of drugs [23]; other authors claim the opposite [24,25]. Another two SNPs, C1236T (rs1128503) and G2677T/A (rs2032582), have been reported to influence the response to several antipsychotics like clozapine, haloperidol and risperidone [26].

We have investigated the effect of polymorphisms in the metabolizing enzymes (*CYP2D6*, *CYP3A4* and *CYP3A5*) and in the drug transporter (*ABCB1*) on the pharmacokinetics of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in a population of healthy volunteers receiving a single oral dose of aripiprazole. In addition, we have analysed the effect of these polymorphisms on adverse drug reactions (ADRs).

## Methods

**Study population.** The study population comprised 148 healthy volunteers (85 men and 63 women) who were enrolled in six bioequivalence clinical trials performed at the Clinical Trial Unit of Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spain). These trials were approved by the Research Ethics Committee of the Hospital, duly authorized by the Spanish Drug Agency and conducted following the guidelines of Good Clinical Practice. All the volunteers gave written informed consent for both clinical trial and pharmacogenetic study. The subjects were free to withdraw from the study at any time.

The inclusion criteria were healthy volunteers aged from 18 to 55 years and free from any organic or psychic conditions. Exclusion criteria were subjects who had received prescribed pharmacological treatment in the last 15 days or any kind of medication in the 48 hr prior to receiving the study medication, body mass index outside the 18.5–30.0 kg/m<sup>2</sup> range, smoker, history of sensitivity to any drug, pregnant women or lactose intolerance.

**Study design and procedures.** All the clinical trials were phase I, single oral dose, randomized, open-label, crossover, two-period, two-sequence, single-centre studies with blind determination of the plasma concentrations of aripiprazole for the responsible analyst. In three of the trials, the volunteers received aripiprazole 10-mg tablets, while in the other three, the volunteers received aripiprazole 10-mg orodispersible tablets. In the first period, each volunteer received a single dose of one formulation of aripiprazole (test or reference). After a washout period of 28 days, each volunteer received the same dose of the other formulation in the second period. The volunteers fasted from 10 hr before to 5 hr after drug administration. In all the studies, the reference formulation was Abilify® (Otsuka Pharmaceutical Laboratories Europe, London, UK). As there were no pharmacokinetic differences among all the formulations (test and reference showed bioequivalence, and orodispersible tablets showed a similar profile to tablets), we used all data for the investigation of the influence of sex

and polymorphisms on the pharmacokinetics of aripiprazole and its metabolite.

Twenty blood samples (before taking the drug and until 72 hr after dosing) were collected in 6-mL sterile EDTA-K2 tubes. Samples were centrifuged at 3500 rpm (1900 × g) for 10 min., and then, plasma was collected and stored at –20°C.

**Drug assay.** Aripiprazole concentrations were measured in an accredited external laboratory by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The lower limit of quantification (LLOQ) was 0.5 ng/mL. The method involved solid-phase extraction procedure with strong cation-exchange and reversed-phase 10-mg plates. Chromatographic separations were performed on a reversed-phase column (Zorbax SB-C18, 4.6 × 50 mm, 3.5 µm, from Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The mobile phase was ammonium formate 1 mM, 0.1% formic acid prepared in Milli-Q, Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA) water: methanol (42:58 v/v). The chromatographic separation was isocratically performed at room temperature at a flow rate of 1.00 mL/min.

Also, dehydro-aripiprazole was determined in 103 volunteers (58 men and 45 women) by LC-MS/MS. For this purpose in our laboratory, we have developed and validated a method for monitoring dehydro-aripiprazole in human plasma using aripiprazole-d8 as the internal standard (IS) [27]. The method was validated according to the recommendations published online by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA). The analytes and IS were extracted from 200 µL of human plasma by solid-phase extraction using Oasis PRIME HLB 96-well µElution Plate, 3 mg sorbent per well (Waters, Madrid, Spain). Separations were carried out at 25°C in an ACE C18-PFP column (4.6 mm × 100 mm and 3-µm particle size (SYM-TA, Madrid, Spain) protected by a 0.2-µm online filter. The mobile phase consisted of a combination of 0.2% formic acid and 0.3% ammonia in Milli-Q water pH 4.0 (solution A) and acetonitrile (solution B) (65:35, v/v). The chromatogram was run under gradient conditions at a flow rate of 0.6 mL/min. Run-time was 5 min. followed by a re-equilibration time of 3 min., to give a total run-time of 8 min. The volume injected into the chromatographic system was 5 µL. The analyte was detected using the multiple reaction monitoring in the positive ionization mode. The LLOQ was 0.35 ng/mL, and the linearity of the method was established in the concentration range 0.35–100 ng/mL.

**Pharmacokinetic analysis.** Pharmacokinetic parameters were estimated by non-compartmental analysis using WinNonlin Professional, version 2.0. (Pharsight Corporation Cary, NC, USA).  $C_{max}$  and  $T_{max}$  were obtained directly from raw data.  $AUC_{0-\infty}$  was calculated as the sum of  $AUC_{0-t}$  and the residual area ( $C_t$  divided by  $k_e$ , with  $C_t$  as the last measured concentration and  $k_e$  as the apparent terminal elimination rate, which was estimated by log-linear regression from the terminal portion of the log-transformed concentration–time plots).  $T_{1/2}$  was calculated by dividing 0.693 by  $k_e$ . The total drug clearance adjusted for bioavailability (CL/F) was calculated by dividing the dose by the  $AUC_{0-\infty}$  and adjusted for weight. Volume of distribution adjusted for bioavailability (V/F) was calculated by dividing the CL/F by  $k_e$ .  $AUC_{0-t}$  and  $C_{max}$  were adjusted for dose and weight and logarithmically transformed for statistical analysis. For dehydro-aripiprazole only  $AUC_{0-t}$  (truncated to 72 hr) and  $C_{max}$  were calculated because there were not enough sampling times in the elimination phase. The ratio of  $AUC_{0-t}$  of dehydro-aripiprazole/aripiprazole was also calculated.

**Genotyping.** DNA was extracted from 1 mL of peripheral blood samples using an automatic DNA extractor (MagNa Pure® System, Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, USA) and quantified spectrophotometrically in a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Wilmington, Delaware, USA). The following polymorphisms were

analysed: *CYP3A4*\*20, *CYP3A4*\*22, *CYP3A5*\*3, *CYP2D6* (\*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*9, copy number variations, \*1  $\times$  N and \*4  $\times$  N) and three SNPs on *ABCB1* (C3435T, C1236T and G2677T/A). All the polymorphisms (except *CYP2D6* \*1  $\times$  N, \*4  $\times$  N) were genotyped using real-time polymerase chain reaction (PCR). *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4 and *CYP2D6*\*5 were determined using a LightCycler instrument version 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), while the others were performed in a StepOne™ instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The *CYP3A4*\*20 polymorphism was genotyped using KASPar SNP Genotyping System (LGC Genomics, Herts, UK). The Sequence Detection System ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) was used for fluorescence detection and allele assignment. All *CYP3A4*\*20 carriers were confirmed by Sanger sequencing run on an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**CYP2D6 copy number assays.** Copy number variations in the *CYP2D6* gene were determined using a commercial assay, TaqMan Copy Number Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which detects a specific sequence on exon 9 (Assay ID: Hs00010001\_cn). All samples were run in quadruplicate in a StepOne Plus PCR instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A known copy number of *CYP2D6* sample from Coriell Institute was used as positive control (three copies, Coriell ID: NA17221). The assay was performed with an endogenous control, RNaseP TaqMan Copy Number Reference Assay (Assay ID: 4403326; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To calculate the exact copy number of samples, we used CopyCaller Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); this software uses the comparative  $\Delta\Delta CT$  method for this purpose [28]. For those subjects who were heterozygous and had three or more copies of the gene, allele-specific copy number variations were identified using Droplet Digital PCR technology following the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Pleasanton, CA, USA).

**Safety.** Throughout the study, the volunteers were inquired about any experienced adverse events (AE). Also, those AEs spontaneously notified by the volunteer were recorded. Karch and Lasagna criteria were used to determine causality [29] and only those which were definite, probable or possible were considered as ADRs. According to the drug label [1], ADRs were classified using 'System Organ Class' allocation as general, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinary, neurological, psychiatric and respiratory.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using the SPSS 23.0 software (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA); *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

Hardy–Weinberg equilibrium was estimated for all analysed variants, using a Fisher exact test based on the De Finetti program [30]. Differences in the genotypic frequencies of variants according to gender were determined using a corrected Pearson  $\chi^2$ -test. To study the influence of genotypes on pharmacokinetics, we used ANOVA (except for polymorphisms with only two categories where we used *t*-test). Tukey's post hoc test was used to compare means between groups. The corrected Pearson  $\chi^2$ -test was applied to compare the relationship between ADRs and genotypes.

Pharmacokinetic data were logarithmically transformed, except  $T_{max}$  and ratio of  $AUC_{0-t}$  of dehydro-aripiprazole/aripiprazole, in accordance with EMA guideline on the investigation of bioequivalence [31].

G2677T/A genotypes were divided into three groups depending on the activity of the alleles: 'A/A+A/T', 'C/A+C/T' and 'C/C'. Also, we only found a carrier of the allele \*20 so we regrouped him with the carriers of the allele \*22.

As there were three SNPs of the *ABCB1* and these variables are partially linked, models were run to determine the relationship among them as well as their possible second-order interactions with each dependent.

Multiple linear regression models were used to study factors related to all the pharmacokinetic dependent variables. Variable selection procedures enter and stepwise with probabilities of entry and exit of 0.05 and 0.1 were used. Models for each dependent with standardized ( $\beta$ ) and unstandardized (B) regression coefficients are shown in "Results" section. Goodness of fit is shown by multivariate coefficient of determination  $R^2$  corrected and global adjust by ANOVA *F* statistic and significance.

Logistic regression models with dichotomous outcome were used to study factors related to the following ADRs: any ADR, dizziness, headache and nausea/vomiting. Variable selection procedures enter and stepwise forward (likelihood ratio) with probabilities of entry and exit of 0.05 and 0.1 were used. Significance of coefficients and odds ratio (OR) is shown in "Results" section. In both models, assumptions were checked.

## Results

### Demographic characteristics.

Our study population comprised 148 healthy volunteers (85 men and 63 women) who were enrolled in six bioequivalence clinical trials. Average age was similar between men and women ( $25.4 \pm 6.7$  years *versus*  $27.8 \pm 8.8$  years, respectively). However, men were taller than women ( $1.76 \pm 0.06$  m *versus*  $1.64 \pm 0.06$  m;  $p < 0.001$ ) and weighed more ( $76.2 \pm 9.0$  kg *versus*  $61.4 \pm 8.3$  kg;  $p < 0.001$ ). All the subjects were Caucasian, except 11 latin, one mixed and one Black.

### Genotypic frequencies.

All genetic variants analysed were in Hardy–Weinberg equilibrium ( $p \geq 0.05$ , Pearson  $\chi^2$  test), except *CYP2D6*\*7 because no subject expressed this allele.

All subjects were genotyped for all the variants, except for *CYP3A4*\*20 ( $n = 144$  subjects). Genotype frequencies are shown in table 1. These frequencies did not differ between men and women.

### Pharmacokinetic analysis.

Table 2 shows mean and standard deviation of the pharmacokinetic parameters of aripiprazole and dehydro-aripiprazole of the total amount of volunteers and according to sex.

Women had higher values of  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$  and V/F of aripiprazole compared to men, as table 2 shows, but there were no differences in CL/F. After adjusting  $AUC_{0-t}$  and  $C_{max}$  for dose/weight, they still remained statistically significant ( $p = 0.021$  and  $p = 0.020$ ), but both parameters were higher in men than in women. In contrast, for dehydro-aripiprazole, there were no differences except in unadjusted  $C_{max}$ . However, the total active moiety (sum of aripiprazole and dehydro-aripiprazole) was higher in women for  $AUC_{0-t}$  ( $2143.0 \pm 415.1$  *versus*  $1942.4 \pm 414.0$  in men;  $p = 0.014$ ) and  $C_{max}$  ( $61.0 \pm 11.7$  *versus*  $53.4 \pm 10.1$  in men;  $p = 0.001$ ). After adjusting both parameters for dose/weight, they still remained statistically significant ( $p = 0.011$  and  $p = 0.016$ ) but both of them were higher in men than in

Table 1.

Genotype frequencies of enzymes and transporter genes in our population (n = 148).

| Genotype                | n (%)      | Genotype      | n (%)      |
|-------------------------|------------|---------------|------------|
| <i>CYP2D6</i>           |            | <i>CYP3A5</i> |            |
| *1/*1                   | 76 (51.4)  | *1/*1         | 5 (3.4)    |
| *1/*3                   | 4 (2.7)    | *1/*3         | 34 (23.0)  |
| *1/*4                   | 43 (29.1)  | *3/*3         | 109 (73.6) |
| *1/*5                   | 7 (4.7)    | <i>ABCB1</i>  |            |
| *1/*6                   | 1 (0.7)    | C3435T        | 40 (27.0)  |
| *1/*9                   | 6 (4.1)    | C/C           | 72 (48.6)  |
| *3/*3                   | 1 (0.7)    | C/T           |            |
| *4/*4                   | 2 (1.4)    | T/T           | 36 (24.3)  |
| *1 × 2/*1               | 6 (4.1)    |               |            |
| *1 × 2/*4               | 1 (0.7)    | C1236T        |            |
| *1 × 3/*1               | 1 (0.7)    | C/C           | 48 (32.4)  |
| <i>CYP2D6</i> Phenotype |            | C/T           | 75 (50.7)  |
| PM                      | 3 (2.0)    | T/T           | 25 (16.9)  |
| IM                      | 61 (41.2)  |               |            |
| EM                      | 77 (52.0)  | G2677T/A      |            |
| UM                      | 7 (4.7)    | A/A           | 22 (14.9)  |
| <i>CYP3A4</i>           |            | A/T           | 1 (0.7)    |
| *1/*1                   | 141 (95.3) | A/C           | 73 (49.3)  |
| *1/*20                  | 1 (0.7)    | C/T           | 3 (2.0)    |
| *1/*22                  | 6 (4.1)    | C/C           | 49 (33.1)  |

PM, IM, EM, UM: poor, intermediate, extensive and ultra-rapid *CYP2D6* metabolizers. CYP, cytochrome p450 oxidase; *ABCB1*, ATP-binding cassette subfamily B 1.

women. No differences between men and women in the ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole ( $p = 0.466$ ) were found.

#### *Influence of genetic polymorphisms on pharmacokinetics.*

The pharmacokinetic parameters of aripiprazole (table 3), dehydro-aripiprazole and total active moiety (table 4) according to different genotypes of studied polymorphisms are reflected as mean and standard deviation.

*Influence of CYP2D6 on pharmacokinetics of aripiprazole.* *CYP2D6* phenotype was associated with changes in the pharmacokinetic parameters of aripiprazole. As the number of active alleles decreased,  $AUC_{0-t}$  ( $p < 0.001$ ) and  $T_{1/2}$  ( $p < 0.001$ ) were higher and  $CL/F$  was lower ( $p < 0.001$ ).  $C_{max}$  was also influenced by *CYP2D6* phenotype ( $p = 0.045$ ), but these differences were not statistically significant after adjusting for weight ( $p = 0.078$ ).

For dehydro-aripiprazole, as the number of active *CYP2D6* alleles decreased, a significant decrease in  $AUC_{0-t}$  and  $C_{max}$  was observed ( $p < 0.001$  in both cases).

Furthermore, the ratio of  $AUC_{0-t}$  dehydro-aripiprazole/aripiprazole was also influenced by *CYP2D6* ( $p < 0.001$ ). Also, *CYP2D6* phenotype had an impact on the  $AUC_{0-t}$  of the total active moiety ( $p = 0.018$ ), but after adjusting for dose/weight, these differences were not statistically significant ( $p = 0.106$ ).

*Influence of CYP3A4 on pharmacokinetics of aripiprazole.* Neither pharmacokinetic parameters of aripiprazole nor dehydro-aripiprazole were influenced by *CYP3A4* genotype (tables 3 and 4). However, a trend was observed as the only

subject who was a carrier of the allele \*20 had a higher  $AUC_{0-t}$  of aripiprazole, a lower  $AUC_{0-t}$  of dehydro-aripiprazole and a very low ratio. This subject was EM for *CYP2D6* but its parameters were similar to IM *CYP2D6* subjects.

*Influence of CYP3A5 on pharmacokinetics of aripiprazole.* Although there were no statistically significant differences on pharmacokinetic parameters of aripiprazole or dehydro-aripiprazole between the *CYP3A5* polymorphisms (tables 3 and 4), we found an association between *CYP3A5*\*3 and the ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole, as \*1/\*1 and \*1/\*3 subjects had higher values of this parameter when compared to \*3/\*3 ( $p = 0.019$ ).

*Influence of ABCB1 on pharmacokinetics of aripiprazole.* None of the SNPs on this gene had a significant effect on neither the  $AUC_{0-t}$  nor the  $C_{max}$  of aripiprazole, but its clearance was influenced by C1236T ( $p = 0.023$ ) and G2677T/A genotypes ( $p = 0.037$ ), as C/C subjects had higher values of this parameter compared to T/T C1236T and A/A G2677T/A.

As shown in table 4,  $AUC_{0-t}$  of the dehydro-aripiprazole was influenced by G2677T/A ( $p = 0.021$ ) and C1236T polymorphisms ( $p = 0.039$ ) and the same happened with the  $C_{max}$  ( $p = 0.037$  and  $p = 0.036$ , respectively), as subjects with C/C genotype had higher values of this two parameters when compared with the other categories. Also, the ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole was influenced by G2677T/A ( $p = 0.026$ ) and C3435T ( $p = 0.050$ ) polymorphisms.

After running the model to determine the relationship among the three above-mentioned SNPs, only the C1236T SNP was associated with the dependent variables, and there were no significant interactions with the other two SNPs on the same gene.

#### *Pharmacokinetic multiple regression analysis.*

Multiple regression analysis (table 5) showed that all the pharmacokinetic parameters of the parent drug (except clearance) were influenced by sex and *CYP2D6* phenotype. Clearance was affected by C1236T SNP on *ABCB1* gene and *CYP2D6* phenotype. Likewise,  $AUC_{0-t}$  and  $C_{max}$  of dehydro-aripiprazole were influenced by C1236T SNP and *CYP2D6* phenotype.  $AUC_{0-t}$  of the total active moiety was related to sex and *CYP2D6* phenotype and  $C_{max}$  was only influenced by sex. The ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole was influenced by *CYP2D6* phenotype and *CYP3A5* genotype.

#### *Adverse drug reactions.*

During the development of these studies, 108 volunteers (73.0%) suffered at least one ADR. The most frequent ADRs were dizziness (38.5%), nausea/vomiting (30.4%), prolonged QTc (21.6%) and headache (19.6%). By group, the most frequent ADRs were neurological (52.0%) and gastrointestinal (31.8%).

Subjects who suffered at least one ADR had higher values of unadjusted  $AUC_{0-t}$  ( $1695.9 \pm 414.8$  versus  $1458.7 \pm 318.3$ ,  $p = 0.001$ ) and  $C_{max}$  of aripiprazole



Table 2.

Pharmacokinetic parameters of aripiprazole and dehydro-aripiprazole according to sex (t-test).

|  | ARI              |                  |                    | DHARI            |                 |                   |
|--|------------------|------------------|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|
|  | All<br>(n = 148) | Men<br>(n = 85)  | Women<br>(n = 63)  | All<br>(n = 103) | Men<br>(n = 58) | Women<br>(n = 45) |
| AUC <sub>0-t</sub> (ng h/mL)               | 1631.8 ± 404.1   | 1557.9 ± 400.6   | 1731.4 ± 390.1**   | 396.3 ± 141.8    | 369.5 ± 127.4   | 430.9 ± 153.0     |
| AUC <sub>0-t</sub> /DW<br>(ng hr mg/mL kg) | 10884.6 ± 2156.7 | 11223.8 ± 2146.8 | 10427.1 ± 2100.8*† | 2706.2 ± 884.0   | 2802.6 ± 919.2  | 2581.9 ± 830.1    |
| C <sub>max</sub> (ng/mL)                   | 49.3 ± 11.1      | 46.5 ± 9.7       | 53.1 ± 11.7***     | 7.0 ± 2.4        | 6.5 ± 2.2       | 7.6 ± 2.6*        |
| C <sub>max</sub> /DW<br>(ng mg/mL kg)      | 334.1 ± 65.6     | 344.8 ± 65.7     | 319.6 ± 63.2*†     | 47.8 ± 14.9      | 49.4 ± 15.7     | 45.6 ± 13.8       |
| T <sub>max</sub> (hr)                      | 3.2 ± 1.6        | 3.0 ± 1.6        | 3.3 ± 1.7          |                  |                 |                   |
| T <sub>1/2</sub> (hr)                      | 52.2 ± 20.7      | 48.2 ± 18.2      | 57.7 ± 22.7**†     |                  |                 |                   |
| V/F (L/kg)                                 | 4.2 ± 0.8        | 3.9 ± 0.7        | 4.6 ± 0.8***†      |                  |                 |                   |
| CL/F (mL/hr kg)                            | 63.3 ± 21.4      | 63.1 ± 20.2      | 63.7 ± 23.0        |                  |                 |                   |

Values are expressed as mean ± standard deviation. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  versus men. †Statistically significant in multiple regression analysis including polymorphisms. ARI, aripiprazole; AUC<sub>0-t</sub>/DW, AUC<sub>0-t</sub> adjusted for dose and weight; C<sub>max</sub>/DW, C<sub>max</sub> adjusted for dose and weight; DHARI, dehydro-aripiprazole.

(50.6 ± 11.4 versus 45.7 ± 9.5,  $p = 0.017$ ) as well as higher values of unadjusted AUC<sub>0-t</sub> (2097.3 ± 425.7 versus 1858.4 ± 375.9,  $p = 0.008$ ) and C<sub>max</sub> (58.3 ± 11.2 versus 52.8 ± 11.3,  $p = 0.023$ ) of the total active moiety. Headache was influenced by sex, but these differences were in the limit of the statistical significance (women 27.0% versus men 14.1%;  $p = 0.051$ ). Nausea/vomiting was more frequent in women than in men (42.9% versus 21.2%;  $p = 0.005$ ) and was also influenced by pharmacokinetics. The volunteers who suffered this ADR had higher values of unadjusted AUC<sub>0-t</sub> (1807.2 ± 411.7 versus 1555.1 ± 377.8,  $p < 0.001$ ) and C<sub>max</sub> of aripiprazole (53.7 ± 11.2 versus 47.4 ± 10.6,  $p < 0.001$ ) as well as higher values of unadjusted AUC<sub>0-t</sub> (2199.0 ± 428.2 versus 1957.3 ± 404.3,  $p = 0.008$ ) and C<sub>max</sub> (60.6 ± 9.5 versus 55.1 ± 11.9,  $p = 0.018$ ) of the total active moiety. Also, we found an association between CYP2D6 phenotype and nausea/vomiting ( $p = 0.014$ ) being more frequent in PM (33.3%) and IM (44.3%) subjects compared to EM (20.8%) and UM (14.3%). An association between CYP3A5\*3 and the development of dizziness was also found (60% of \*1/\*1 subjects, 20.6% of \*1/\*3 subjects and 43.1% of \*3/\*3 subjects;  $p = 0.028$ ).

After performing a multiple logistic regression, the development of any ADR was only influenced by the AUC<sub>0-t</sub> of aripiprazole ( $p = 0.002$ ; OR = 1.308 for every increase in 0.1 units of the Ln AUC<sub>0-t</sub>). Headache was not influenced by sex or other factors ( $p = 0.065$ ). The development of nausea/vomiting was still influenced by sex ( $p = 0.03$ ; OR = 2.29) and AUC<sub>0-t</sub> of aripiprazole ( $p = 0.003$ ; OR = 1.289 for every increase in 0.1 units of the Ln AUC<sub>0-t</sub>) but it was not influenced by CYP2D6 phenotype anymore. Finally, CYP3A5\*3 and sex had an effect on the development of dizziness as women and \*1/\*1 subjects (when compared to \*1/\*3) were more prone to suffer this ADR ( $p = 0.034$ , OR = 2.158;  $p = 0.009$ , OR = 0.281, respectively).

The development of any ADR and of nausea/vomiting was also influenced by the AUC<sub>0-t</sub> of the total active moiety, but as there were only 103 subjects for this variable and the

statistical significance was better for the AUC<sub>0-t</sub> of aripiprazole, we chose the AUC<sub>0-t</sub> of the parent drug as independent variable for the logistic regression model. However, any ADR was related to dehydro-aripiprazole's pharmacokinetics.

## Discussion

### Sex influence on pharmacokinetics.

The pharmacokinetic parameters obtained in our study are similar to those published in the literature [32,33] and shown in the drug label [1]. AUC<sub>0-t</sub>, C<sub>max</sub>, T<sub>1/2</sub> and V/F were higher in women than in men. These results are consistent with information in the drug label [1], which states that 'C<sub>max</sub> and AUC of aripiprazole are 30% to 40% higher in women than in men. These differences, however, are largely explained by differences in body-weight (25%) between men and women'. However, we found small differences (14% and 11% for unadjusted C<sub>max</sub> and AUC<sub>0-t</sub>, and 7% for both parameters after adjusting for dose/weight) that were statistically significant even after adjusting for dose/weight. AUC<sub>0-t</sub> and C<sub>max</sub> were lower in women, although there were no differences in CL/F. Influence of sex on drug pharmacokinetics is a quite well-known aspect. There are different factors involved in these differences, such as hormonal changes or body composition [34,35]. Women present a higher V/F than men, due to their higher fat percentage [34]. As there were no differences in CL/F or ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole, the fact that adjusted AUC<sub>0-t</sub> and C<sub>max</sub> are lower in women than in men could be explained by the higher V/F in women. Nevertheless, the differences between men and women are small (around 10%) and less relevant than differences among CYP2D6 genotypes; so, they do not justify a different dose because of sex.

### Influence of genetic polymorphisms on pharmacokinetics.

CYP2D6. Our study confirms the influence of CYP2D6 polymorphisms on the pharmacokinetics of aripiprazole and our results are in accordance with other authors [12,19,36,37].

Table 3.

Association between pharmacokinetic parameters of aripiprazole and genetic polymorphisms (t-test or ANOVA).

| Polymorphisms         | AUC <sub>0-t</sub> (ng hr/mL)               | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (hr)          | CL/F (mL/hr kg)                               |
|-----------------------|---|--------------------------|--------------------------------|---|
| <i>CYP2D6</i>         |   |                          |                                |   |
| PM (n = 3)            | 2247.3 ± 615.1 <sup>\$\$\$&amp;&amp;†</sup> | 55.6 ± 20.9              | 76.7 ± 10.3 <sup>\$\$\$†</sup> | 36.7 ± 5.8 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;†</sup>  |
| IM (n = 61)           | 1804.3 ± 393.7 <sup>\$\$\$&amp;†</sup>      | 52.0 ± 11.3 <sup>†</sup> | 60.6 ± 23.5 <sup>\$\$\$†</sup> | 53.3 ± 18.1 <sup>\$\$\$&amp;&amp;&amp;†</sup> |
| EM (n = 77)           | 1497.9 ± 337.3                              | 46.8 ± 10.3              | 45.8 ± 15.7                    | 70.4 ± 18.7                                   |
| UM (n = 7)            | 1337.0 ± 245.2                              | 50.7 ± 9.2               | 39.4 ± 11.5                    | 84.3 ± 29.9                                   |
| <i>CYP3A4</i>         |   |                          |                                |   |
| *1/*1 (n = 141)       | 1627.2 ± 409.2                              | 49.3 ± 11.3              | 51.8 ± 20.4                    | 63.8 ± 21.5                                   |
| *1/*22 (n = 6)        | 1706.7 ± 311.8                              | 48.1 ± 4.1               | 59.9 ± 29.4                    | 55.0 ± 15.2                                   |
| *1/*20 (n = 1)        | 1829.8                                      | 53.1                     | 67.0                           | 40.0  |
| <i>CYP3A5</i>         |   |                          |                                |   |
| *1/*1 (n = 5)         | 2000.9 ± 747.7                              | 58.5 ± 17.9              | 51.4 ± 25.9                    | 72.0 ± 34.9                                   |
| *1/*3 (n = 34)        | 1671.3 ± 335.7                              | 49.9 ± 8.2               | 56.9 ± 24.2                    | 60.9 ± 19.4                                   |
| *3/*3 (n = 109)       | 1602.5 ± 399.4                              | 48.7 ± 11.4              | 50.8 ± 19.3                    | 63.7 ± 21.3                                   |
| <i>ABCB1</i> C3435T   |   |                          |                                |   |
| C/C (n = 40)          | 1514.8 ± 355.2                              | 47.0 ± 10.0              | 46.9 ± 15.9                    | 66.5 ± 19.0                                   |
| C/T (n = 72)          | 1664.4 ± 413.2                              | 49.9 ± 11.3              | 51.9 ± 19.2                    | 63.6 ± 22.2                                   |
| T/T (n = 36)          | 1696.6 ± 420.5                              | 50.7 ± 11.8              | 58.9 ± 26.4                    | 59.2 ± 22.1                                   |
| <i>ABCB1</i> C1236T   |   |                          |                                |   |
| C/C (n = 48)          | 1497.8 ± 353.6                              | 47.4 ± 10.2              | 50.0 ± 16.8                    | 64.8 ± 19.2 <sup>*a</sup>                     |
| C/T (n = 75)          | 1665.2 ± 381.9                              | 49.2 ± 11.0              | 50.5 ± 19.8                    | 65.1 ± 21.3 <sup>*</sup>                      |
| T/T (n = 25)          | 1788.8 ± 490.5                              | 53.1 ± 12.5              | 61.8 ± 27.5                    | 55.2 ± 24.2                                   |
| <i>ABCB1</i> G2677T/A |   |                          |                                |   |
| A/A + A/T (n = 23)    | 1743.2 ± 486.4                              | 53.0 ± 13.1              | 60.4 ± 28.5                    | 57.8 ± 25.2 <sup>*</sup>                      |
| C/A+ C/T (n = 76)     | 1676.0 ± 405.4                              | 49.2 ± 11.2              | 53.6 ± 20.7                    | 62.2 ± 20.9                                   |
| C/C (n = 49)          | 1511.0 ± 333.1                              | 47.7 ± 9.7               | 46.4 ± 14.3                    | 67.6 ± 19.7                                   |

\* $p \leq 0.05$  versus reference genotype in bivariate analysis.  $^{\$}p \leq 0.05$ ,  $^{\$\$}p \leq 0.01$  and  $^{$$$}p \leq 0.001$  versus *CYP2D6* EM and  $^{\&}p \leq 0.05$ ,  $^{\&\&}p \leq 0.01$  and  $^{\&\&\&}p \leq 0.001$  versus *CYP2D6* UM.

<sup>†</sup>Statistically significant in multiple regression analysis. Showing  $p$ -values adjusted for dose/weight (for AUC<sub>0-t</sub> and C<sub>max</sub>).

Reference genotype: C3435T T/T, C1236T T/T, G2677T/A C/C.

Currently, regulatory agencies as the FDA or the EMA are including pharmacogenetic information in drug labels. As the Abilify<sup>®</sup> FDA drug label [1] states, PMs have around an 80% increase in aripiprazole exposure and a 30% decrease in exposure to dehydro-aripiprazole compared to EM resulting in a 60% higher exposure to the total active moieties. In our study, in PM the AUC<sub>0-t</sub> of aripiprazole was increased by 50% compared to EM while AUC<sub>0-t</sub> of dehydro-aripiprazole was decreased by 33%. Regarding total active moieties, PMs were exposed to 31% greater concentrations than EM, results that are very similar to the showed by Hendset *et al.* 2007 [12]. According to these results, we agree suggesting a dose reduction similar to that of 50% in PM recommended by FDA [1]. Despite this evidence, the genotyping of *CYP2D6* is not implemented in routine clinical practice yet and we consider that this study can help to educate physicians in the importance of genotyping patients in order to adjust dose and to prevent ADRs produced by high concentrations of drugs.

*CYP3A4*. In our study, *CYP3A4*\*22 did not show a significant effect on the pharmacokinetic parameters of aripiprazole nor of dehydro-aripiprazole, as also reported by other studies carried out in patients [36,38]. On the basis of these results, we conclude that although it seems *CYP3A4* enzyme plays an important role on the metabolism of both aripiprazole and dehydro-aripiprazole [39], its identified allelic variants like *CYP3A4*\*22 are not able to predict variability in

drug response to aripiprazole. However, we did not find any subject carrying two \*22 alleles which could show a significant influence in the clearance of the drug. Further, we only identified one subject carrying one *CYP3A4*\*20 allele who showed a very low dehydro-aripiprazole/aripiprazole ratio; these data should be confirmed in other studies.

*CYP3A5*. So far, little is known about the effect of *CYP3A5*\*3 on aripiprazole metabolism. Currently, studies have reported no influence of *CYP3A5*\*3 on pharmacokinetics of aripiprazole [19,37,40]. Interestingly, our results showed that the dehydro-aripiprazole/aripiprazole ratio is influenced by *CYP3A5*\*3, with \*3/\*3 subjects having a lower metabolism, which is consistent with previous information of this allelic variant [18]. However, the influence of *CYP3A5* on the pharmacokinetics of aripiprazole and dehydro-aripiprazole is much smaller than the *CYP2D6*, as \*3/\*3 have around a 10% reduced ratio compared to \*1/\*3 and PM have a 50% reduced ratio compared to EM.

*ABCB1*. We showed for the first time the influence of the C1236T SNP on the pharmacokinetics of aripiprazole. The lower clearance of aripiprazole in T/T subjects could be related to a lower activity of P-gp in these subjects [41]. The effect of this SNP on the clearance of several drugs, mainly chemotherapies such as docetaxel [42] and irinotecan [43], has been previously described and these results are in agreement

Table 4.

Association between genetic polymorphisms and pharmacokinetic parameters of dehydro-aripiprazole and of aripiprazole+ dehydro-aripiprazole (t-test or ANOVA).

| Polymorphisms         | DHARI                                   |                                     | DHARI+ARI                    |                          | Ratio                                 |
|-----------------------|---|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
|                       | AUC <sub>0–t</sub> (ng hr/mL)           | C <sub>max</sub> (ng/mL)            | AUC <sub>0–t</sub> (ng h/mL) | C <sub>max</sub> (ng/mL) | DHARI/ARI                             |
| <i>CYP2D6</i>         |   |                                     |                              |                          |                                       |
| PM (n = 3)            | 291.8 ± 43.1 <sup>&amp;</sup>           | 6.0 ± 1.3                           | 2539.1 ± 632.7 <sup>a</sup>  | 61.6 ± 21.1              | 0.14 ± 0.04 <sup>++&amp;&amp;a</sup>  |
| IM (n = 43)           | 340.3 ± 116.8 <sup>+++&amp;&amp;a</sup> | 6.1 ± 2.2 <sup>++&amp;&amp; a</sup> | 2133.8 ± 409.8               | 57.1 ± 10.0              | 0.20 ± 0.07 <sup>+++&amp;&amp;a</sup> |
| EM (n = 50)           | 431.9 ± 142.3                           | 7.6 ± 2.4                           | 1932.9 ± 401.8               | 55.7 ± 12.3              | 0.29 ± 0.10                           |
| UM (n = 7)            | 531.2 ± 143.7                           | 8.9 ± 2.6                           | 1868.2 ± 344.8               | 59.6 ± 10.3              | 0.40 ± 0.09 <sup>++a</sup>            |
| <i>CYP3A4</i>         |   |                                     |                              |                          |                                       |
| *1/*1 (n = 96)        | 394.3 ± 138.4                           | 7.0 ± 2.4                           | 2021.4 ± 435.9               | 56.8 ± 11.8              | 0.25 ± 0.10                           |
| *1/*22 (n = 6)        | 459.4 ± 185.6                           | 7.9 ± 3.1                           | 2166.1 ± 202.2               | 56.0 ± 5.8               | 0.29 ± 0.16                           |
| *1/*20 (n = 1)        | 212.4                                   | 4.0                                 | 2042.2                       | 57.1                     | 0.12                                  |
| <i>CYP3A5</i>         |   |                                     |                              |                          |                                       |
| *1/*1 (n = 5)         | 488.5 ± 106.5                           | 8.7 ± 1.7                           | 2489.5 ± 715.1               | 67.3 ± 17.7              | 0.28 ± 0.12                           |
| *1/*3 (n = 26)        | 424.1 ± 132.7                           | 7.5 ± 2.3                           | 2100.3 ± 304.6               | 57.8 ± 9.5               | 0.27 ± 0.11 <sup>a</sup>              |
| *3/*3 (n = 72)        | 379.8 ± 144.5                           | 6.7 ± 2.5                           | 1972.7 ± 421.1               | 55.6 ± 11.4              | 0.25 ± 0.10                           |
| <i>ABCB1</i> C3435T   |   |                                     |                              |                          |                                       |
| C/C (n = 33)          | 417.4 ± 151.1                           | 7.3 ± 2.5                           | 1930.2 ± 395.8               | 54.4 ± 11.8              | 0.29 ± 0.11 <sup>*</sup>              |
| C/T (n = 44)          | 405.7 ± 141.4                           | 7.2 ± 2.5                           | 2092.4 ± 443.1               | 58.0 ± 10.9              | 0.25 ± 0.10                           |
| T/T (n = 26)          | 353.6 ± 125.7                           | 6.3 ± 2.1                           | 2051.1 ± 419.8               | 57.5 ± 11.9              | 0.22 ± 0.10                           |
| <i>ABCB1</i> C1236T   |   |                                     |                              |                          |                                       |
| C/C (n = 38)          | 400.2 ± 135.8 <sup>*a</sup>             | 7.1 ± 2.3 <sup>*a</sup>             | 1914.8 ± 376.2               | 54.3 ± 10.4              | 0.28 ± 0.10                           |
| C/T (n = 47)          | 418.2 ± 147.9                           | 7.4 ± 2.6                           | 2106.1 ± 436.0               | 58.2 ± 11.6              | 0.26 ± 0.10                           |
| T/T (n = 18)          | 330.8 ± 124.1                           | 5.9 ± 2.1                           | 2074.6 ± 459.0               | 57.9 ± 12.9              | 0.21 ± 0.10                           |
| <i>ABCB1</i> G2677T/A |   |                                     |                              |                          |                                       |
| A/A + A/T (n = 16)    | 335.4 ± 131.3 <sup>*</sup>              | 6.0 ± 2.2 <sup>*</sup>              | 2078.1 ± 474.8               | 59.1 ± 13.2              | 0.21 ± 0.11 <sup>*</sup>              |
| C/A + C/T (n = 50)    | 396.3 ± 142.4                           | 7.1 ± 2.5                           | 2079.2 ± 446.9               | 57.2 ± 12.1              | 0.25 ± 0.10                           |
| C/C (n = 37)          | 422.6 ± 140.9 <sup>*</sup>              | 7.4 ± 2.4                           | 1.942.7 ± 363.8              | 55.1 ± 9.8               | 0.29 ± 0.11                           |

ARI, aripiprazole; DHARI, dehydro-aripiprazole.

\* $p \leq 0.05$  versus reference genotype in bivariate analysis.  $^+p \leq 0.05$ ,  $^{++}p \leq 0.01$  and  $^{+++}p \leq 0.001$  versus *CYP2D6* EM and  $^{\&}p \leq 0.05$ ,  $^{\&\&}p \leq 0.01$  and  $^{\&\&\&}p \leq 0.001$  versus *CYP2D6* UM. <sup>a</sup>statistically significant in multiple regression analysis. Showing  $p$ -values adjusted for dose/weight (for AUC<sub>0-t</sub> and C<sub>max</sub>). Reference genotype: C3435T T/T, C1236T T/T, G2677T/A C/C, CYP3A5 \*1/\*1.

Table 5.

Multiple regression coefficients of the pharmacokinetic analysis, showing coefficients for napierian logarithm of dependents variables (except for AUC<sub>0-t</sub> ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole).

| Multiple regression coefficients        |                |          |        |                 |        |                 |       |                 |                  |        |        |
|---|----------------|----------|--------|-----------------|--------|-----------------|-------|-----------------|------------------|--------|--------|
| Dependent variable                      | Adjusted $R^2$ | Constant | Sex    | C1236T genotype |        | CYP3A5 genotype |       | CYP3A4 genotype | CYP2D6 phenotype |        |        |
|   |                |          |        | T/T             | C/T    | *1/*1           | *1/*3 |                 | PM               | IM     | UM     |
| Adjusted AUC <sub>0-t</sub> (ARI)       | 0.210          | 9.241    | -0.074 |                 |        |                 |       |                 | 0.385            | 0.146  | -0.035 |
| Adjusted C <sub>max</sub> (ARI)         | 0.057          | 5.783    | -0.078 |                 |        |                 |       |                 | 0.125            | 0.083  | 0.090  |
| T <sub>1/2</sub>                        | 0.211          | 3.696    | 0.182  |                 |        |                 |       |                 | 0.516            | 0.267  | -0.160 |
| V/F (ARI)                               | 0.237          | 1.378    | 0.167  |                 |        |                 |       |                 | -0.203           | -0.061 | 0.006  |
| CL/F (ARI)                              | 0.250          | -2.674   |        | -0.159          | -0.007 |                 |       |                 | -0.664           | -0.273 | 0.180  |
| Adjusted AUC <sub>0-t</sub> (DHARI)     | 0.213          | 7.999    |        | -0.200          | -0.052 |                 |       |                 | -0.352           | -0.235 | 0.235  |
| Adjusted C <sub>max</sub> (DHARI)       | 0.196          | 3.963    |        | -0.233          | -0.053 |                 |       |                 | -0.197           | -0.211 | 0.088  |
| Adjusted AUC <sub>0-t</sub> (ARI+DHARI) | 0.094          | 9.522    | -0.087 |                 |        |                 |       |                 | 0.239            | 0.042  | 0.010  |
| Adjusted C <sub>max</sub> (ARI + DHARI) | 0.056          | 5.977    | -0.09  |                 |        |                 |       |                 |                  |        |        |
| AUC <sub>0-t</sub> ratio DHARI/ARI      | 0.373          | 0.281    |        |                 |        | 0.058           | 0.470 |                 | -0.195           | -0.101 | 0.112  |

Reference genotype or phenotype: C1236T C/C, CYP3A5 \*3/\*3 and CYP2D6 EM. Reference for sex category: women.

ARI, aripiprazole; DHARI, dehydro-aripiprazole.

with ours, as T/T subjects had a lower clearance too. Also, T/T subjects had lower  $AUC_{0-t}$  and  $C_{max}$  of the dehydro-aripiprazole, a fact that might be caused by an induction effect of the P-gp on the responsible cytochromes on the transformation from aripiprazole to dehydro-aripiprazole (mainly CYP3A4). As previously reported [44], T/T subjects for G2677T/A (linked to C1236T and C3435T) had a decrease in CYP3A4 induction by rifampicin. In our study, the low levels of dehydro-aripiprazole described in T/T subjects for C1236T could be explained by a possible decrease in CYP3A4 induction. The greater influence of this SNP on the levels of the dehydro-aripiprazole than on the levels of the parent drug could be due to a higher affinity of dehydro-aripiprazole to P-gp [45].

Our negative findings regarding the other two SNPs (C3435T and G2677T/A) are in agreement with those reported in a population of Japanese adult patients [19]. However, a study performed recently in Caucasian paediatric patients showed an effect of both polymorphisms on the pharmacokinetics of aripiprazole as subjects with the 2677TT/3435TT genotype had lower aripiprazole concentrations [38]. Up to now, studies focusing on the role of these polymorphisms on the pharmacokinetics of different drugs have been discordant; consequently, further research is required before adjusting dose recommendations could be advised.

#### Adverse drug reactions.

In our study population, females and subjects with higher concentrations of aripiprazole showed more often nausea/vomiting. Influence of sex on ADRs has been reported in several studies [46,47]; the higher percentage of women suffering ADRs might be due to their higher exposure to drugs [48]. As previously published by our group [49], there seems to be a clear relationship between concentrations of aripiprazole and the development of ADRs as reported in an extensive review [50]; the higher percentage of ADRs (especially nausea/vomiting) in subjects with higher  $AUC_{0-t}$  found in our study could be due to a higher blockage of dopamine receptors. Aripiprazole concentrations are more important than dehydro-aripiprazole concentrations to produce these side effects. Although CYP2D6 seemed to be associated with the development of nausea/vomiting, this relationship was only due to higher concentrations of aripiprazole in the subjects with slower CYP2D6 phenotype (PM and IM). Thus, CYP2D6 phenotype could be a good pharmacogenetic marker for predicting the risk of nausea/vomiting.

As CYP3A5 is also expressed in the brain [51], higher frequencies of dizziness for \*1/\*1 subjects found in our study could be due to a significant role of this enzyme in the brain metabolism of aripiprazole which could possibly lead to a modified response to the drug, as previously shown with other psychotropic drugs like alprazolam [52].

While both aripiprazole and aripiprazole + dehydro-aripiprazole concentrations were related to ADRs like nausea/vomiting, concentrations of aripiprazole would have a greater impact on the safety of this drug. In summary, concentrations of aripiprazole along with the sex were the main factors

implied in the development of ADRs in the treatment with aripiprazole while genetic polymorphisms had a minor role.

#### Study limitations.

The main limitation of our study is the impossibility to evaluate the influence of the above-mentioned polymorphisms on the efficacy of the drug and the development of chronic ADRs (like extrapyramidal symptoms, weight gain or diabetes). Also, we consider that the time sampling was not long enough for an adequate evaluation of AUC and elimination of dehydro-aripiprazole and for subjects with long  $T_{1/2}$  of aripiprazole like CYP2D6 PM subjects. Another limitation of our study is that aripiprazole and dehydro-aripiprazole were measured by two different analytical laboratories but as both laboratories use methods that have been validated according to the guidelines of regulatory agencies, we consider that it hardly has any impact on the results. On the other hand, our study enables us to evaluate the effect of genetic polymorphisms on the response to aripiprazole without the interference of confounding factors such as smoking, concomitant treatments and the characteristics of the psychiatric diseases. Moreover, the multiple regression analysis, allow us to evaluate the role of each polymorphism.

It is important to consider that these results must be interpreted with caution because pharmacokinetics and tolerability could be different in psychotic patients receiving long-term treatment. In addition, it would be desirable to increase the sample size in order to improve statistical power, mainly for some rare genotypes.

#### Conclusions

The pharmacokinetics of aripiprazole is affected mainly by CYP2D6 phenotype and to a lesser extent by sex and C1236T SNP in ABCB1 gene, while the pharmacokinetics of dehydro-aripiprazole solely is affected by CYP2D6 and C1236T SNP. Also, CYP3A5\*3 (along with CYP2D6) has an impact on the ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole. The pharmacokinetics of aripiprazole and dehydro-aripiprazole is not affected by neither CYP3A4\*22 nor C3435T and G2677T/A SNPs on ABCB1 gene. Also, the development of ADRs is mainly influenced by aripiprazole's concentrations and sex but also CYP3A5 and CYP2D6 polymorphisms had an effect on the safety of aripiprazole.

#### Conflicts of interest

Francisco Abad-Santos and Dolores Ochoa have been consultants or investigators in clinical trials sponsored by the following pharmaceutical companies: Abbott, Alter, Chemo, Cinfa, FAES, Farmalíder, Ferrer, GlaxoSmithKline, Galenicum, Gilead, Janssen-Cilag, Kern, Normon, Novartis, Servier, Silverpharma, Teva, and Zambon. Miriam Saiz-Rodríguez is co-financed by Consejería de Educación, Juventud y Deporte from Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo. The remaining authors declare no conflict of interests.

#### Acknowledgements

This study would not have been possible without the cooperation of the volunteers and the effort of the staff of the



Clinical Trials Unit of Hospital Universitario de la Princesa. The authors are grateful to Mr. Jesús Garrido for his invaluable help in statistical analysis.

## References

- Food and Drug Administration. Aripiprazole label (2014). [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/021436s038,021713s030,021729s022,021866s023b1.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021436s038,021713s030,021729s022,021866s023b1.pdf) (accessed on 1 July 2017).
- Burris KD, Molski TF, Xu C, Ryan E, Tottori K, Kikuchi T *et al.* Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**302**:381–9.
- Jordan S, Koprivica V, Chen R, Tottori K, Kikuchi T, Altar CA. The antipsychotic aripiprazole is a potent, partial agonist at the human 5-HT1A receptor. *Eur J Pharmacol* 2002;**441**:137–40.
- Shapiro DA, Renock S, Arrington E, Chiodo LA, Liu LX, Sibley DR *et al.* Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology* 2003;**28**:1400–11.
- Goodnick PJ, Jerry JM. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother* 2002;**3**:1773–81.
- Patteet L, Morrens M, Maudens KE, Niemegeers P, Sabbe B, Neels H. Therapeutic drug monitoring of common antipsychotics. *Ther Drug Monit* 2012;**34**:629–51.
- McGavin JK, Goa KL. Aripiprazole. *CNS Drugs* 2002;**16**:779–86.
- Citrome L, Josiassen R, Bark N, Salazar DE, Mallikaarjun S. Pharmacokinetics of aripiprazole and concomitant lithium and valproate. *J Clin Pharmacol* 2005;**45**:89–93.
- Wood MD, Scott C, Clarke K, Westaway J, Davies CH, Reavill C *et al.* Aripiprazole and its human metabolite are partial agonists at the human dopamine D2 receptor, but the rodent metabolite displays antagonist properties. *Eur J Pharmacol* 2006;**546**:88–94.
- CYP2D6 allele nomenclature. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>. (accessed on 28 February 2017).
- Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 2008;**83**:234–42.
- Hendset M, Hermann M, Lunde H, Refsum H, Molden E. Impact of the CYP2D6 genotype on steady-state serum concentrations of aripiprazole and dehydroaripiprazole. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;**63**:1147–51.
- Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huenemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N *et al.* Identification and characterization of CYP3A4\*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther* 2006;**79**:339–49.
- Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011;**11**:274–8.
- van der Weide K, van der Weide J. The influence of the CYP3A4\*22 polymorphism on serum concentration of quetiapine in psychiatric patients. *J Clin Psychopharmacol* 2014;**34**:256–60.
- Huang W, Lin YS, McConn II DJ, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N *et al.* Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2004;**32**:1434–45.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;**27**:383–91.
- Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenet Genomics* 2012;**22**:555–8.
- Suzuki T, Mihara K, Nakamura A, Kagawa S, Nagai G, Nemoto K *et al.* Effects of genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP3A5, and ABCB1 on the steady-state plasma concentrations of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in Japanese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit* 2014;**36**:651–5.
- Wang JS, Zhu HJ, Donovan JL, Yuan HJ, Markowitz JS, Geesey ME *et al.* Aripiprazole brain concentration is altered in P-glycoprotein deficient mice. *Schizophr Res* 2009;**110**:90–4.
- Gunes A, Spina E, Dahl ML, Scordo MG. ABCB1 polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety. *Ther Drug Monit* 2008;**30**:628–33.
- Yoshimori M, Takada H, Imadome K, Kurata M, Yamamoto K, Koyama T *et al.* P-glycoprotein is expressed and causes resistance to chemotherapy in EBV-positive T-cell lymphoproliferative diseases. *Cancer Med* 2015;**4**:1494–504.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, John A *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with p-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;**97**:3473–8.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI *et al.* Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;**70**:189–99.
- Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T *et al.* MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001;**18**:1400–4.
- Vijayan NN, Mathew A, Balan S, Natarajan C, Nair CM, Allencherry PM *et al.* Antipsychotic drug dosage and therapeutic response in schizophrenia is influenced by ABCB1 genotypes: a study from a south Indian perspective. *Pharmacogenomics* 2012;**13**:1119–27.
- Wojnicz A, Belmonte C, Koller D, Ruiz-Nuño A, Roman M, Ochoa D *et al.* Effective phospholipids removing microelution-solid phase extraction LC-MS/MS method for simultaneous plasma quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole: application to human pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal* 2017;**151**:116–25.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;**3**:1101–8.
- Karch FE, Lasagna L. Toward the operational identification of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1977;**21**:247–254.
- DeFinetti program. <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (accessed on 4 April 2017).
- EMA Guideline on the investigation of bioequivalence, CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/Corr\*. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf). (accessed on 21 December 2016).
- Koue T, Kubo M, Funaki T, Fukuda T, Azuma J, Takaai M *et al.* Nonlinear mixed effects model analysis of the pharmacokinetics of aripiprazole in healthy Japanese males. *Biol Pharm Bull* 2007;**30**:2154–8.
- Kubo M, Koue T, Maune H, Fukuda T, Azuma J. Pharmacokinetics of aripiprazole, a new antipsychotic, following oral dosing in healthy adult Japanese volunteers: influence of CYP2D6 polymorphism. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007;**22**:358–66.
- Schwartz JB. The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2003;**42**:107–21.
- Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, Piccinni A, Carlini M, Vatteroni E *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic drugs: effect of sex. *CNS Spectr* 2013;**18**:118–27.
- van der Weide K, van der Weide J. The influence of the CYP3A4\*22 polymorphism and CYP2D6 polymorphisms on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, pimozide, and risperidone in psychiatric patients. *J Clin Psychopharmacol* 2015;**35**:228–36.
- Jeon JY, Chae SW, Kim MG. Population pharmacokinetics of aripiprazole in healthy Korean subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2016;**54**:293–304.



- 38 Rafaniello C, Sessa M, Bernardi FF, Pozzi M, Cheli S, Cattaneo D *et al.* The predictive value of ABCB1, ABCG2, CYP3A4/5 and CYP2D6 polymorphisms for risperidone and aripiprazole plasma concentrations and the occurrence of adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J* 2017 Jul 18. [Epub ahead of print].
- 39 Kubo M, Koue T, Inaba A, Takeda H, Maune H, Fukuda T *et al.* Influence of itraconazole co-administration and CYP2D6 genotype on the pharmacokinetics of the new antipsychotic ARIPIPRAZOLE. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;**20**:55–64.
- 40 Kim JR, Seo HB, Cho JY, Kang DH, Kim YK, Bahk WM *et al.* Population pharmacokinetic modelling of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in psychiatric patients. *Br J Clin Pharmacol* 2008;**66**:802–10.
- 41 Moons T, de Roo M, Claes S, Dom G. Relationship between P-glycoprotein and second-generation antipsychotics. *Pharmacogenomics* 2011;**12**:1193–211.
- 42 Bosch TM, Huitema AD, Doodeman VD, Jansen R, Witteveen E, Smit WM *et al.* Pharmacogenetic screening of CYP3A and ABCB1 in relation to population pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5786–93.
- 43 Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, Xie R, Baker SD, Verweij J *et al.* Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 2003;**9**:3246–53.
- 44 Lamba J, Strom S, Venkataramanan R, Thummel KE, Lin YS, Liu W *et al.* MDR1 genotype is associated with hepatic cytochrome P450 3A4 basal and induction phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 2006;**79**:325–38.
- 45 Kirschbaum KM, Uhr M, Holthoewer D, Namendorf C, Pietrzik C, Hiemke C *et al.* Pharmacokinetics of acute and sub-chronic aripiprazole in P-glycoprotein deficient mice. *Neuropharmacology* 2010;**59**:474–9.
- 46 Martin RM, Biswas PN, Freemantle SN, Pearce GL, Mann RD. Age and sex distribution of suspected adverse drug reactions to newly marketed drugs in general practice in England: analysis of 48 cohort studies. *Br J Clin Pharmacol* 1998;**46**:505–11.
- 47 Aichhorn W, Whitworth AB, Weiss EM, Hinterhuber H, Marksteiner J. Differences between men and women in side effects of second-generation antipsychotics. *Nervenarzt* 2007;**78**:45–52.
- 48 Nicolson TJ, Mellor HR, Roberts RR. Gender differences in drug toxicity. *Trends Pharmacol Sci* 2010;**31**:108–114.
- 49 Belmonte C, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T, Talegón M, Sánchez-Rojas SD *et al.* Evaluation of the relationship between pharmacokinetics and the safety of aripiprazole and its cardiovascular effects in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 2016;**36**:608–614.
- 50 Sparshatt A, Taylor D, Patel MX, Kapur S. A systematic review of aripiprazole–dose, plasma concentration, receptor occupancy, and response: implications for therapeutic drug monitoring. *J Clin Psychiatry* 2010;**71**:1447–56.
- 51 Booth Depaz IM, Toselli F, Wilce PA, Gillam EM. Differential expression of human cytochrome P450 enzymes from the CYP3A subfamily in the brains of alcoholic subjects and drug-free controls. *Drug Metab Dispos* 2013;**41**:1187–94.
- 52 Pai HV, Upadhyaya SC, Chinta SJ, Hegde SN, Ravindranath V. Differential metabolism of alprazolam by liver and brain cytochrome (P4503A) to pharmacologically active metabolite. *Pharmacogenomics J* 2002;**2**:243–58.

**Artículo 3:** Effective phospholipids removing microelution-solid phase extraction LC-MS/MS method for simultaneous plasma quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole: Application to human pharmacokinetic studies.

**Autores:** Wojnicz A, Belmonte C, Koller D, Ruiz-Nuño A, Román M, Ochoa D, Abad-Santos F.

**J Pharm Biomed Anal. 2018 Mar 20;151:116-125.**



# Effective phospholipids removing microelution-solid phase extraction LC-MS/MS method for simultaneous plasma quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole: Application to human pharmacokinetic studies

Aneta Wojnicz<sup>a,\*,1</sup>, Carmen Belmonte<sup>a,b</sup>, Dora Koller<sup>a</sup>, Ana Ruiz-Nuño<sup>a</sup>, Manuel Román<sup>a,b</sup>, Dolores Ochoa<sup>a,b</sup>, Francisco Abad Santos<sup>a,b,1</sup>

<sup>a</sup> Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain

<sup>b</sup> UICEC Hospital Universitario de la Princesa, Plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 8 September 2017

Received in revised form

18 December 2017

Accepted 22 December 2017

Available online 28 December 2017

### Keywords:

Aripiprazole

Dehydro-aripiprazole

Antipsychotics

Liquid chromatography-tandem mass

spectrometry

Solid phase extraction

Pharmacokinetics

## ABSTRACT

A simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method has been developed and validated for simultaneous quantification of aripiprazole and its active metabolite, dehydro-aripiprazole, in human plasma. Stable isotopically labeled aripiprazole, aripiprazole-D8, has been used as the internal standard (IS) for both analytes. Only 200  $\mu$ l of human plasma was needed for analyte extraction, using effective phospholipids-eliminating three-step microelution-solid-phase extraction (SPE, Oasis PRiME HLB 96-well  $\mu$ Elution Plate). An ACE C18-PFP column was applied for chromatographic separation at 25 °C, protected by a 0.2- $\mu$ m on-line filter. A combination of ammonium formate (5 mM)-acetonitrile (pH 4.0; 65:35, v/v) was used as mobile phase and the chromatogram was run under gradient conditions at a flow rate of 0.6 ml/min. Run time lasted 5 min, followed by a re-equilibration time of 3 min, to give a total run time of 8 min. Five  $\mu$ l of the sample was injected into the chromatographic system. Aripiprazole, dehydro-aripiprazole and IS were detected using the mode multiple reaction monitoring in the positive ionization mode. The method was linear in the concentration range of 0.18–110 ng/ml and 0.35–100 ng/ml for aripiprazole and dehydro-aripiprazole, respectively. Our method has been validated according to the recommendations of regulatory agencies through tests of precision, accuracy, recovery, matrix effect, stability, sensitivity, selectivity and carry-over. Our microelution-SPE method removes more than 99% of main plasma phospholipids compared to protein precipitation and was successfully applied to several bioequivalence studies.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** ARI, aripiprazole; AUC, area under curve; CAL, calibration standard; CID, collision-induced dissociation; C<sub>max</sub>, maximum plasma concentration; CV, coefficient of variation; CYP, cytochrome P450; DAD, diode array detection; DARI, dehydro-aripiprazole; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EMA, European Medicines Agency; ESI, electrospray ionization; FDA, US Food and Drug Administration; HLB, hydrophilic-lipophilic balance; HPLC, high-performance liquid chromatography; IS, internal standard; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLE, liquid-liquid extraction; LLOQ, lower limit of quantification; MRM, multiple-reaction monitoring; PFP, pentafluorophenyl; PPT, protein precipitation; QC, quality control; R<sup>2</sup>, correlation coefficient; t<sub>R</sub>, retention time; SD, standard deviation; SEM, standard error of mean; SIL-IS, stable isotopically labeled internal standards; SLE, supported liquid extraction; SPE, solid phase extraction; SRM, selected ion monitoring; T<sub>max</sub>, time of occurrence of C<sub>max</sub>; T<sub>1/2</sub>, half-life; TIC, total ion chromatogram; UHPLC-MS/M, ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; UV, ultraviolet; XIC, extraction ion chromatogram.

\* Corresponding author at: Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de la Princesa, C/Diego de León 62, 28006 Madrid, Spain.

E-mail addresses: [anetaiwojna.wojnicz@salud.madrid.org](mailto:anetaiwojna.wojnicz@salud.madrid.org) (A. Wojnicz), [carmen.belmonte@salud.madrid.org](mailto:carmen.belmonte@salud.madrid.org) (C. Belmonte), [dora.koller@salud.madrid.org](mailto:dora.koller@salud.madrid.org) (D. Koller), [anaruiznuno@yahoo.es](mailto:anaruiznuno@yahoo.es) (A. Ruiz-Nuño), [manuel.roman@salud.madrid.org](mailto:manuel.roman@salud.madrid.org) (M. Román), [mdolores.ochoa@salud.madrid.org](mailto:mdolores.ochoa@salud.madrid.org) (D. Ochoa), [francisco.abad@salud.madrid.org](mailto:francisco.abad@salud.madrid.org) (F. Abad Santos).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

## 1. Introduction

Aripiprazole (ARI), a quinolinone derivative, is an atypical antipsychotic drug indicated in schizophrenia and schizoaffective disorder [1]. It displays a partial agonist/antagonist activity at dopamine D2 and D3 receptors and serotonin 5-HT1A receptors, whereas it acts as an antagonist at serotonin 5-HT2A receptors [2].

ARI is metabolized to dehydro-aripiprazole (DARI), its main active metabolite, mainly by the cytochrome P450 (CYP) CYP3A4 and CYP2D6 isoenzymes. Both enzyme systems are subjected to drug interactions and genetic polymorphism, dose-adjustment is therefore necessary, especially when it is co-administered with CYP3A4 and CYP2D6 inhibitors or CYP3A4 inducers [3]. Additionally, allelic variants in *ABCB1* and *ABCG2* genes were found to influence the plasma concentrations of antipsychotics, including ARI. The *ABCB1* 2677TT/3435TT genotype has been linked to a significantly lower ARI plasma concentration/dose ratio if compared to patients carrying other *ABCB1* genotypes [4]. Therefore, ARI plasma monitoring is suggested to improve efficacy, avoid drug-drug interactions or decrease adverse effects.

To date, numerous analytical methods have been used for ARI and DARI human plasma determination by high performance liquid chromatography (HPLC, also called 'LC') with ultraviolet detection (UV) and diode array detection (DAD) [5–7]. However, the lower limit of quantification (LLOQ) is lower or the run time is shorter in case of using LC-MS/MS methods with electrospray ionization (ESI). Despite improved sensitivity and selectivity of the LC-MS/MS-based methods, one of the main problems of ESI sources is the ion suppression or enhancement caused by the sample matrix (also known as a 'matrix effect') and interferences from metabolites [8]. Endogenous phospholipids cause ion suppression in both positive and negative ESI modes leading to matrix effect [9] and consequently increased variability and irreproducibility in bioanalytical LC-MS/MS methods. Lipids are the most variable components in human plasma. They can vary significantly among individuals according to diet and metabolic rate. However, glycerophosphatidylcholines, such as phosphatidylcholine, the main phospholipids circulating in the human plasma, constitute up to 70% of total plasma phospholipids [10]. Lysophospholipids, including lysophosphatidylcholine, compose up to 10% of total phospholipids [11]. Therefore, an optimization of an appropriated extraction method, which is able to eliminate phospholipids, combined with the use of stable isotopically labeled internal standards (SIL-IS) is extremely important in order to achieve reliable results and maintain the LC/MS-MS system clean [8,12].

Nonetheless, the majority of LC-MS/MS and ultra-LC-MS/MS (UHPLC-MS/MS) methods with ESI have used protein precipitation (PPT) or liquid liquid extraction (LLE) in addition to non SIL-IS instead of solid phase extraction (SPE) and stable SIL-IS [13–18]. PPT is the fastest, but the least effective sample preparation technique, often resulting in significant matrix effects mainly due to the presence of endogenous phospholipids [11]. As follows, some HPLC-UV or LC-MS/MS methods choose SPE, including supported liquid extraction (SLE) [19], a type of SPE, as an extraction method. Reversed-phase SPE methods are known to provide cleaner extracts and reduce matrix effects compared to PPT [11,12,20]. In spite of the fact that SPE has been applied in many published methods, it is characterized by longer performing times, need of evaporation, reconstitution steps and no usage of SIL-IS [20,21]. Among all these methods, only studies employing SIL-IS based SPE [22] and SLE [19] were able to achieve the best results. Patel et al. also applied UHPLC, which offers shorter analyte separation time due to a higher pressure in the UHPLC system. However, none of the cited methods investigated phospholipids' elimination efficacy of the extraction method applied.

Thus, the aim of the present study was to develop a simple LC-MS/MS method based on effective phospholipids removing three-step microelution-SPE method compared to PPT for simultaneous plasma quantification of ARI and DARI as well as its further application to pharmacokinetic studies and clinical practice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

ARI, DARI and SIL-IS [2H8]-ARI (ARI-D8) were provided by Toronto Research Chemicals (North York, Canada). Acetonitrile, methanol, ammonia solution (at 25%) and ammonia hydroxide 5N (HPLC Grade) were purchased from SYMTA (Madrid, Spain). Formic acid was supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All chemicals were analytical or LC-MS grade. The water for HPLC was obtained using a Milli-Q system (Millipore-Ibérica, Madrid, Spain). Blank human plasma samples from different individual human donors were supplied by the Transfusion Center of the Autonomous Community of Madrid (Madrid, Spain).

### 2.2. Stock solutions, calibration standards (CALs), and quality controls (QCs)

Stock solutions of CALs and QCs of ARI, DARI and ARI-D8 were prepared by dissolving an accurately weighed quantity in 0.5% formic acid solution in methanol to obtain a concentration of 1 mg/ml for all compounds. CALs were made from independent dilutions of each stock solution and spiked in the blank plasma to obtain 8 CALs with the concentrations of 0.18, 0.5, 1.0, 5.0, 25, 50, 100 and 120 ng/ml for ARI and 0.35, 0.5, 1.0, 2.5, 10, 50, 90 and 110 ng/ml for DARI. QC samples were prepared in the same fashion to obtain the four corresponding QC levels (LLOQ, low, medium, and high), as follows: 0.18, 0.5, 55, 110 ng/ml for ARI and 0.35, 0.7, 45, and 90 ng/ml for DARI. Secondary IS solution of 1000 ng/ml ARI-D8 was diluted 20 times to give a working solution of 50 ng/ml.

A drug-free blank plasma sample and a drug-free zero plasma sample (processed with IS) were included according to the recommendations for bioanalytical method validation of the US Food and Drug Administration (FDA) [23], the European Medicines Agency (EMA) [24] and the International Conference on Harmonisation (ICH) [25]. All CALs, QC, and IS solutions were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use or analysis.

### 2.3. Chromatographic conditions

The HPLC system consisted of a 1200 Series separation module (Agilent Technologies, Madrid, Spain) controlled by Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition software for programming samples and chromatographic conditions. Separations were carried out at  $25^{\circ}\text{C}$  in an ACE C18-PFP column (3- $\mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 100$  mm; SYMTA, Madrid, Spain) at 0.6 ml/min. The mobile phase consists of ammonium formate (5 mM, solvent A)-acetonitrile (solvent B) (pH 4.0; 65:35, v/v). The chromatogram was run under gradient condition as follows: initial conditions: 65% (A) and 35% (B); 0–0.1 min, gradually increasing eluent B to 75% (B); 0.1–0.5 min, gradually increasing eluent B to 90%; 0.5–1.5 min, gradually increasing eluent B to 99% and maintain from 1.5 to 3.0 min; 3.0–3.2 min returning to the initial conditions (65% A and 35% B) and maintain from 3.2 to 5.0 min. The chromatogram was followed by a re-equilibration time of 3.0 min. The volume injected into the HPLC was 5  $\mu\text{l}$ .

**Table 1**  
Retention time (tR) in minutes (min), ions and fragmentation conditions used for selected reaction monitoring (SRM) of aripiprazole, dehydro-aripiprazole, the stable isotope-labeled internal standard, aripiprazole-D8 and phospholipids.

| Compound             | Retention<br>time (tR, min) | Quantification SRM<br>transition (m/z) | Confirmation SRM<br>transition (m/z) | Dwell<br>time (ms) | Fragmentor<br>voltage (V) | Collision<br>energy (eV) |
|----------------------|-----------------------------|--|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------------|
| Aripiprazole         | 3.644                       | 448.2 > 285.2                          | 448.2 > 176.2                        | 100                | 100                       | 25                       |
| Dehydro-aripiprazole | 3.451                       | 446.2 > 285.2                          | 446.2 > 188.0                        | 100                | 100                       | 35                       |
| Aripiprazole-D8      | 3.582                       | 456.2 > 293.2                          |                                      | 100                | 110                       | 30                       |
| Phospholipids        | 1.477                       | 184.1 > 184.1                          |                                      | 100                | 100                       | 5                        |

#### 2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometry detection system consisted of an Agilent Technologies 6410B, triple quadrupole with ESI in positive ion mode. The mass spectrometry measurement was operated in multiple-reaction monitoring (MRM) mode. The desolvation gas (nitrogen) and flow is operated at 350 °C and 12 l/min, respectively. The nebulizer pressure was 60 psi and the capillary voltage was 5 kV. The MS collision gas was highly pure N<sub>2</sub> (>99.9995). The dwell time, fragmentor voltage and collision energy were optimized under selected ion monitoring (SRM) for all the compounds (Table 1). After separation by HPLC, the peak area corresponding to the mass-to-charge ratio (m/z) transition for the quantifier ion was measured as relative to the m/z transition for its IS. The m/z transition for the qualifier ion was also monitored to add specificity to the results. Additionally, monitoring of m/z 184 > 184 as a common in-source collision-induced dissociation (CID) ion fragment produced by endogenous phospholipids, glycerophosphocholines, was used [26] (Table 1). The integration peak area of the MRM transitions of each analyte was calculated using MassHunter Workstation Quantitative Analysis software (Agilent Technologies, Madrid, Spain).

#### 2.5. Sample preparation

For sample clean-up, two different types of extraction were tested in order to check phospholipids' elimination capacity. Therefore, to choose the best sample preparation method, twelve different plasma samples were extracted using simple PPT or three-step microelution-SPE. For PPT, 200 µl of plasma sample was spiked with 10 µl of IS and 800 µl of precipitating agent, acetonitrile with 1% formic acid (4:1, v/v) and centrifuged at 14000 rpm and 4 °C for 5 min. Then the supernatant was evaporated to dryness using a concentrator (5301, Eppendorf, Germany) at 45 °C for 1 h and 15 min. Consequently, the dry residue was reconstituted with 200 µl of the acetonitrile/methanol/buffer (ammonium formate, 5 mM at pH 4.0) reconstitution solution (8:1:1, v/v/v) and 5 µl of sample was injected into the LC-MS/MS system.

On the other hand, Oasis PRiME HLB (hydrophilic-lipophilic balance) 96-well µElution Plate, 3 mg Sorbent per Well (Waters, Madrid, Spain) was used for SPE of the analytes. Sample preparation was fast and simple. Microelution-SPE consisted of only three-steps: sample loading, washing and elution. 200 µl of plasma sample was spiked with 10 µl of IS and 290 µl of 0.2% formic acid, pH 2.0, and loaded (2 × 250 µl) into the µElution Plate. Next, a washing step with 400 µl (2 × 250 µl) of 5% methanol solution in MilliQ water and addition of 2% ammonia was applied. Vacuum between 5 and 15 mmHg was applied in each step of the SPE process. Elution was performed with 200 µl (2 × 100 µl) of acetonitrile/methanol/buffer (ammonium formate, 5 mM at pH 4.0) solution (8:1:1, v/v/v) and collected in a 1 ml 96-well plate (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Then, 5 µl of eluate was directly injected into the LC-MS/MS system without evaporation and reconstitution. Finally, SPE was chosen as sample preparation for method validation.

#### 2.6. Assay validation procedures

The method was validated according to the recommendations published online by the FDA [23], EMA [24] and ICH [25].

##### 2.6.1. Calibration curve, selectivity and LLOQ

Quantitative analysis of ARI and DARI in plasma was carried out using the method of IS. Eight CALs were used for validation to cover the range of clinically relevant concentrations expected in most of the healthy volunteers. A quadratic regression was used to calculate the equation related to the area ratio of each analyte versus IS to the concentration of the analytes in the CALs. Weighting factor of 1/x was used to obtain the best fit for all CALs. Six standard curves from different days were analyzed. To fulfill validation criteria, the error of accuracy and coefficient of variation (CV) should not exceed 15% for all CALs, except for the LLOQ (<20%). To be considered LLOQ, the extraction ion chromatogram (XIC) peak area ratio of each analyte should be at least 5 times higher than that of the blank.

The selectivity of the method was studied by analyzing blank plasma samples from 6 different individual human donors, with the addition of IS (zero plasma) or without the IS. The method is considered selective, when the XIC peak area ratio is less than 5 times of the LLOQ for ARI and DARI, and less than 20 times for the IS.

##### 2.6.2. Precision and accuracy

The precision and accuracy of the method were evaluated by analyzing 6 replicates per 4 concentration QCs levels (LLOQ and low, medium, and high) in a single analytical run that covered the calibration curve range. The intra-day precision and accuracy were assessed by analyzing a single analytical run in a single day. The inter-day variation was evaluated over 3 analytical runs from 3 different days. Precision was measured as a CV (%) and accuracy as the percentage difference between the theoretical and the measured concentration according to the following equation:

$$\text{Accuracy (\%)} = \frac{(\text{concentration measured} - \text{theoretical concentration})}{(\text{theoretical concentration})} \times 100\%$$

To verify precision and accuracy, the error must be less than 15% for all samples except the LLOQ (<20%).

##### 2.6.3. Extraction recovery and matrix effect

Recovery is measured as the ratio of the compound concentration (relative) or XIC peak area (absolute) in plasma following SPE (pre-extracted sample) to the same analyte concentration spiked directly in blank plasma sample that had undergone the process of SPE (post-extracted sample). The matrix effect of human plasma was evaluated by comparing the ratio of the compound concentration (relative) or XIC peak area (absolute) in post-extracted sample to the pure solution of the analyte. Pure solution of the analyte was obtained by the addition of the same amount of analyte to the final elution solution [acetonitrile/methanol/buffer, pH 4.0 (8:1:1, v/v/v)], which had not undergone the extraction process.



In both tests six repetitions of the LLOQ, low QC and high QC were analyzed in at least blank plasma samples from 6 different individual human donors for all analytes. The recovery of QC samples had to be precise, reliable, and reproducible. To validate the matrix effect, the CV should not exceed 15% for all the QCs and less than 20% for LLOQ. All recovery and matrix effect values were calculated as absolute and relative to its IS.

#### 2.6.4. Stability

The stability of ARI and DARI at different conditions has been already evaluated in many articles. However, we conducted the following assays at low and high QC (4 replicates each) for ARI and DARI to check the stability of the analytes in our laboratory conditions:

- in the human plasma samples: after 24 h at room temperature and at 4 °C in the fridge; after 3 cycles of freeze-thaw in the freezer at –80 °C
- in the human plasma sample extract: after 24 h at 19 °C in the autosampler.

Analyte stability need not to be 100%, but it had to be between 85 and 115% and CV should be less than 15% for all the QCs studied.

#### 2.6.5. Carry-over

Carry-over was evaluated by injecting blank samples after CAL at the highest concentration. The XIC peak area of blank sample injected after CAL at the upper limit of quantification could not exceed 20% of the LLOQ and 5% of the IS XIC peak area. To prevent carry-over the needle was washed 5 times between injections (vial and flash port) with water and acetonitrile solution (50:50, v/v).

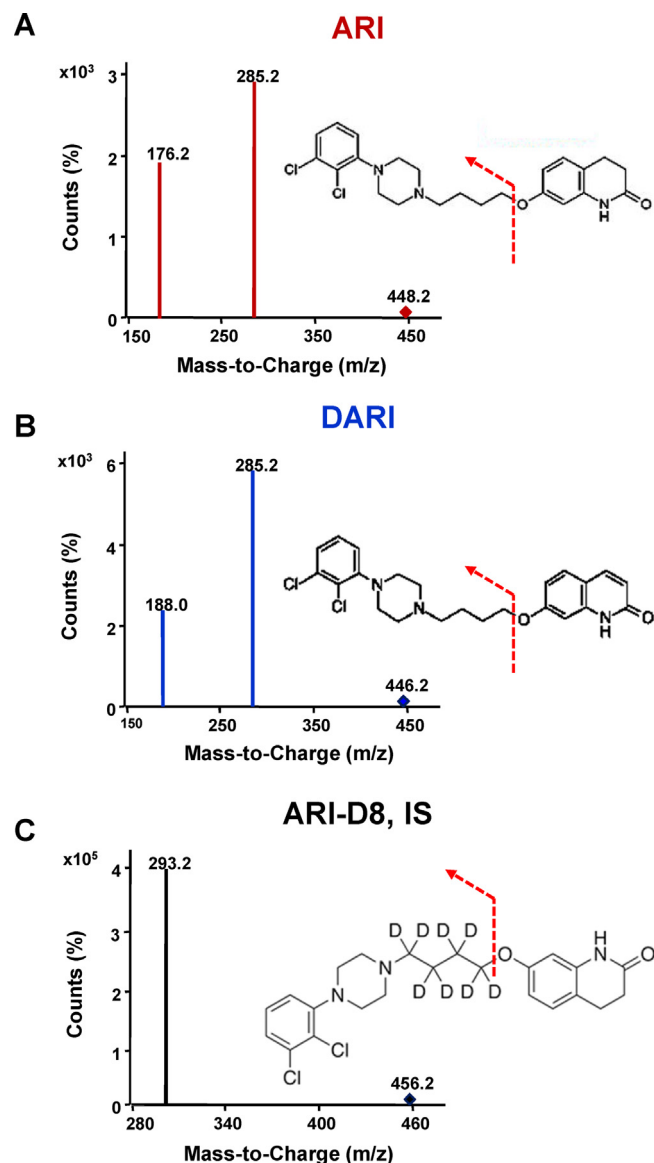
#### 2.6.6. Application of the method to pharmacokinetics of ARI and DARI in healthy volunteers

Our method was successfully applied to pharmacokinetic analysis of 1133 samples from 103 healthy volunteers who received a single oral dose of ARI (10 mg) in several bioequivalence studies under fasting conditions. Blood samples were taken at the following time intervals after dosing: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 and 72 h. Blood samples were collected in EDTA dipotassium dihydrate (EDTA K2) tubes (Vacuette, Madrid, Spain) and centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4 °C. The plasma was separated and stored at –20 °C. The study was approved by the local ethics committee (Clinical Research Ethics Committee of “Hospital Universitario de la Princesa”, Madrid, Spain), and informed consent was obtained from the healthy volunteers. Pharmacokinetic parameters were estimated by noncompartmental analysis using WinNonLin Professional Edition, version 2.0 (Scientific Consulting, Inc., Cary, NC). Maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and time to  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) were determined directly from plasma concentration data. The area under the plasma concentration–time curve from time 0 to the time of the last measurable concentration ( $AUC_{0-t}$ ) was calculated using the trapezoidal method. The half-life ( $T_{1/2}$ ) was calculated as  $\ln 2/k_e$ , the apparent terminal elimination rate, which was estimated by long-linear regression from the terminal portion of the log-transformed concentration–time plots.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of MS/MS conditions and chromatography

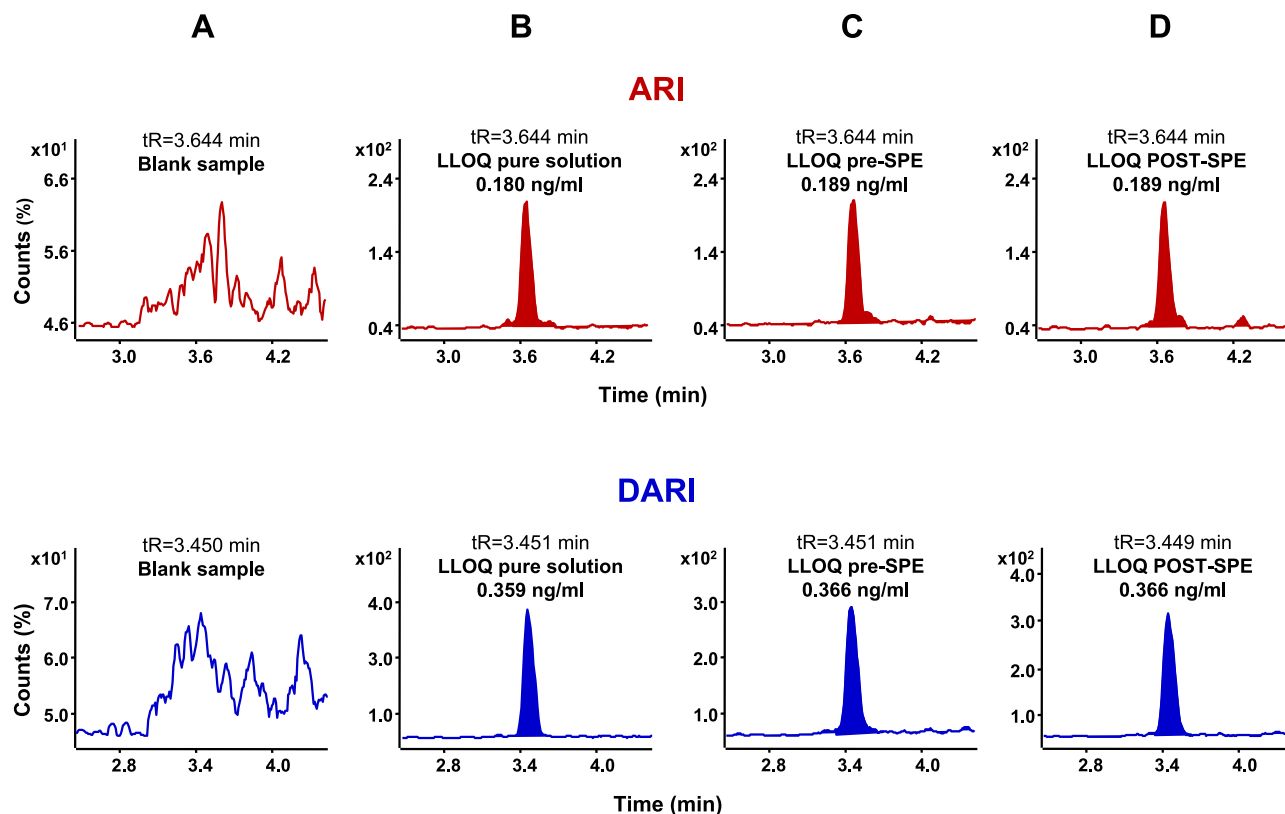
The full scan spectra in positive ESI mode indicated that all analytes were protonated molecules  $[M+H]^+$  which were therefore selected to detect the most abundant products. Fig. 1 shows the percentages of abundance of the precursor and product ions of the quantifier, qualifier, or IS versus mass to charge (m/z) for ARI (A)



**Fig. 1.** Product ion spectra and chemical structures of aripiprazole (ARI, A), dehydro-aripiprazole (DARI, B) and the stable isotope-labeled internal standard (SIL-IS), aripiprazole-D8 (ARI-D8, C), obtained by collision-induced dissociation (CID) of the indicated precursor ions  $[M+H]^+$ . The fragmentation patterns of all analytes are indicated by an arrow on the chemical structure of each analyte. The residual precursor and the product ions, quantifier and qualifier, are shown in the figure. The results are presented as the percentage of counts versus mass-to-charge (m/z). All mass peaks have been normalized to the most abundant.

DARI (B) and ARI-D8 (C) under SRM and the fragmentation pattern of quantifier transition. Table 1 summarizes all the optimized mass spectrometer parameters, such as the transition in SRM mode, dwell time, fragmentor voltage and collision energy for each analyte (quantifier and qualifier ion) and the IS. For each analyte, a second transition named qualifier ion was optimized to confirm the analysis. Qualifier ratio, the ratio of qualifier ion/quantifier ion of ARI and DARI, has been monitored for CALs, QCs and real samples and has been constant through the analysis.

The chromatographic separation was run under gradient conditions to reach better resolution of the three compounds. Fig. 2 displays a typical XIC of a blank human plasma (A), pure solution (B) and blank human plasma spiked with LLOQ before (pre-extracted sample, C) and after SPE (post-extracted sample, D) of both, ARI and DARI. The retention times ( $t_R$ ) were very consistent throughout the recordings (Table 1). The  $t_R$  was 3.644 min, 3.451 min and



**Fig. 2.** Extraction ion chromatograms (XIC) of aripiprazole (ARI) and dehydro-aripiprazole (DARI), respectively. Human blank plasma (A), lower limit of quantification (LLOQ) of ARI and DARI in pure solution (B), human plasma spiked with LLOQ of ARI and DARI before microelution-solid phase extraction (SPE; pre-extracted sample, C) and after SPE, (post-extracted sample, D) procedure. Retention times ( $t_R$ ) and concentration values calculated from calibration curves are given for both analytes. The results are presented as the percentage of counts versus acquisition time in minutes (min). All chromatograms have been normalized to the largest peak.

3.582 min for ARI, DARI and ARI-D8, respectively. Thus, the  $t_R$  of ARI and DARI were very similar. Although the complete analyte separation was not achieved, despite the ICH guideline requirements [25], proper MS detector settings (MRM mode) have been applied to prevent detector-side selectivity. For MS analysis, it is a commonly described phenomenon that due to the presence of 8 deuteriums, the IS (ARI-D8) elutes significantly earlier than unlabeled ARI. Therefore, the different elution times between ARI-D8 and the compounds of interest (ARI and DARI) prevent fully compensation of the ionization effects. Based on these facts, an effective phospholipids' removing SPE clean-up method has been applied to ensure the success of the present assay design. The recording time was 5 min followed by 3 min for re-equilibration owing to gradient elution.

Due to the similarities of ARI and its metabolite, the chromatographic separation seems to be complicated. However, when large sample amount for clinical pharmacokinetic studies is processed, the time of analysis of a single sample is extremely important. Thus, XBridge BEH C18 column (2.5- $\mu$ m, 2.1  $\times$  75 mm) and ACE C18-pentafluorophenyl (PFP) column (3- $\mu$ m, 4.6  $\times$  100 mm) were applied to separate both of the analytes under the same mobile phase conditions. Based on our results, we have chosen C18 column with PFP group for analyte separation. Due to  $\pi$ - $\pi$  interactions with the aromatic ring and NH<sub>2</sub> groups, ACE C18- PFP column has a better resolution and improves analyte separation compared to ordinary C18 column. Our total chromatographic run lasted 8 min, similar to other authors [13]. Although shorter analytical runs ranging from 1.2 min to 7.5 min exist [15,22], there are mostly isocratic separations, which tend to cause problems in repeatability in retention time, XIC peak area and peak height or linearity of the calibration curve [27].

Another important factor to consider is the injection volume. Taking into account the particle size of the column, we have injected 5  $\mu$ l of the sample into the LC-MS/MS system. On the contrary, several LC-MS/MS methods have used larger injection volume ranging between 20–100  $\mu$ l [14,15,20], which can cause carry-over effect and shorter the analytical column life-time.

### 3.2. Calibration curve, selectivity and LLOQ

The method was linear in the range of 0.18–120 ng/ml for ARI and 0.35–110 ng/ml for DARI. The correlation coefficient ( $R^2$ ) values were  $0.9979 \pm 0.0026$  for ARI and  $0.9995 \pm 0.0004$  for DARI ( $n = 6$ ). We obtained satisfactory  $R^2$ , similar to other methods [13,15,17]. Our calibration range was adjusted according to the real samples' concentration ( $55.72 \pm 14.58$  ng/ml for ARI and  $7.01 \pm 2.44$  ng/ml for DARI), enabling us to obtain pharmacokinetic data for both ARI and its metabolite.

The present method was selective, as no significant interference was found in the detection of ARI and DARI in the absence or presence of the IS in 6 different blank samples. Fig. 2 shows the selectivity of the method. Fig. 2A displays an XIC of blank sample, while Fig. 2B, 2C and 2D shows ARI and DARI at LLOQ concentration, sample. LLOQs XIC peak area ratio is 5 times higher than the one of the blank sample and remained at similar concentrations in pure solution, in pre-extracted and post-extracted sample, corroborating the selectivity of the method.

The LLOQs of 0.18 ng/ml for ARI and 0.35 ng/ml for DARI presented adequate intra- and inter-day accuracy and CV values (Table 2). The analyte XIC area/blank area ratio was  $18.03 \pm 13.60$  for ARI and  $12.82 \pm 8.19$  for DARI, being more than 5 times higher than that of any blank plasma. The XIC area of the zero plasma,

**Table 2**

Intra- and inter-day precision and accuracy assays. Data were obtained from 4 quality controls (QCs) –the lower limit of quantification (LLOQ), low, medium and high – on the same day as intra-day and on 3 consecutive days as inter-day precision and accuracy assays. Precision data are expressed as the percentage of the coefficient of variation (CV) for repeated measurement and accuracy as the percentage of the closeness of theoretical concentration to the measured value present in the matrix. The corresponding concentrations are displayed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the number of total experiments is shown in parenthesis.

| Compound             | Concentration<br>(ng/mL) | Intra-day<br>(n = 6)  |        |              | Inter-day<br>(n = 18) |        |              |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------|--------------|-----------------------|--------|--------------|
|                      |                          | Mean $\pm$ SD (ng/mL) | CV (%) | Accuracy (%) | Mean $\pm$ SD (ng/mL) | CV (%) | Accuracy (%) |
| Aripiprazole         | 0.18 (LLOQ)              | 0.19 $\pm$ 0.00       | 2.34   | 4.49         | 0.18 $\pm$ 0.01       | 6.07   | 1.22         |
|                      | 0.5                      | 0.49 $\pm$ 0.02       | 3.49   | –2.37        | 0.50 $\pm$ 0.02       | 4.15   | 0.80         |
|                      | 55                       | 57.26 $\pm$ 1.43      | 2.50   | 4.12         | 56.11 $\pm$ 4.83      | 8.61   | 2.02         |
|                      | 110                      | 119.81 $\pm$ 31.88    | 1.57   | 8.92         | 120.51 $\pm$ 12.02    | 9.97   | 9.56         |
| Dehydro-aripiprazole | 0.35 (LLOQ)              | 0.35 $\pm$ 0.01       | 4.13   | 0.94         | 0.37 $\pm$ 0.02       | 4.53   | 4.30         |
|                      | 0.7                      | 0.67 $\pm$ 0.01       | 1.43   | –4.11        | 0.67 $\pm$ 0.03       | 4.73   | –4.28        |
|                      | 45                       | 49.15 $\pm$ 1.68      | 3.43   | 9.23         | 47.93 $\pm$ 5.08      | 10.61  | 6.51         |
|                      | 90                       | 95.23 $\pm$ 5.36      | 5.63   | 5.82         | 96.35 $\pm$ 10.10     | 10.48  | 7.05         |

**Table 3**

Extraction recovery and matrix effect tests. Recoveries and matrix effect are expressed as absolute and relative (to their stable isotope-labeled internal standard) values. Averaged data are given as the percentage of the mean recovery/matrix effect  $\pm$  standard deviation (SD) and coefficient of variant (CV) of the total number shown in parenthesis of the lower limit of quantification (LLOQ), and low and high quality controls (QCs).

| Compound             | Concentration (ng/mL) | Recovery (n = 6)  |                   |          |          | Matrix effect (n = 6) |                   |          |          |
|----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|----------|----------|-----------------------|-------------------|----------|----------|
|                      |                       | Mean $\pm$ SD (%) |                   | CV (%)   |          | Mean $\pm$ SD (%)     |                   | CV (%)   |          |
|                      |                       | Absolute          | Relative          | Absolute | Relative | Absolute              | Relative          | Absolute | Relative |
| Aripiprazole         | 0.18 (LLOQ)           | 91.12 $\pm$ 6.70  | 98.75 $\pm$ 6.81  | 7.35     | 6.89     | 95.34 $\pm$ 7.49      | 105.25 $\pm$ 8.66 | 7.85     | 8.23     |
|                      | 0.5                   | 95.78 $\pm$ 8.46  | 105.74 $\pm$ 3.59 | 8.84     | 3.39     | 95.57 $\pm$ 8.51      | 97.63 $\pm$ 6.03  | 8.91     | 6.18     |
|                      | 110                   | 95.40 $\pm$ 4.77  | 106.41 $\pm$ 3.05 | 5.00     | 2.87     | 100.00 $\pm$ 8.98     | 99.99 $\pm$ 0.60  | 8.98     | 0.60     |
| Dehydro-aripiprazole | 0.35 (LLOQ)           | 88.12 $\pm$ 7.96  | 96.35 $\pm$ 5.74  | 9.03     | 5.96     | 92.73 $\pm$ 4.81      | 101.53 $\pm$ 5.22 | 5.18     | 5.14     |
|                      | 0.7                   | 89.90 $\pm$ 1.07  | 100.66 $\pm$ 4.10 | 1.19     | 4.07     | 90.00 $\pm$ 18.05     | 92.10 $\pm$ 6.61  | 8.47     | 7.18     |
|                      | 90                    | 94.12 $\pm$ 5.23  | 106.19 $\pm$ 3.94 | 5.55     | 3.71     | 98.15 $\pm$ 8.53      | 98.23 $\pm$ 0.82  | 8.69     | 0.83     |
| Aripiprazole-D8      | LLOQ                  | 92.21 $\pm$ 3.54  |                   | 3.84     |          | 91.12 $\pm$ 5.04      |                   | 5.54     |          |
|                      | low QC                | 90.79 $\pm$ 8.18  |                   | 9.01     |          | 93.52 $\pm$ 2.59      |                   | 2.77     |          |
|                      | high QC               | 88.51 $\pm$ 5.61  |                   | 6.33     |          | 96.35 $\pm$ 3.22      |                   | 3.34     |          |

with its IS, was 20 times larger than the area of the blank plasma (725.04  $\pm$  212.14 for both, ARI and DARI). To date, the lowest LLOQs were obtained by Patel et al. [22] with the value of 0.05 ng/ml for ARI and by Song and colleagues [17] with the value of 0.01 ng/ml for DARI. While not reaching the before-mentioned values, we still outperformed other UHPLC- and LC-MS/MS methods developed by different authors [14,16,18,20,21].

### 3.3. Precision and accuracy

Table 2 summarizes the results for precision and accuracy with standard deviation (SD), CV and accuracy calculated for each sample. The intra- and inter-day precision was optimal with CV less than 11% and accuracy lower than 10%. These results are similar to those obtained by Song and his group [17] and better comparing to Kubo et al. [15] and Choong and co-workers [21]. Thus, the method is reproducible and accurate for ARI and DARI.

### 3.4. Extraction recovery, matrix effect and phospholipids removal

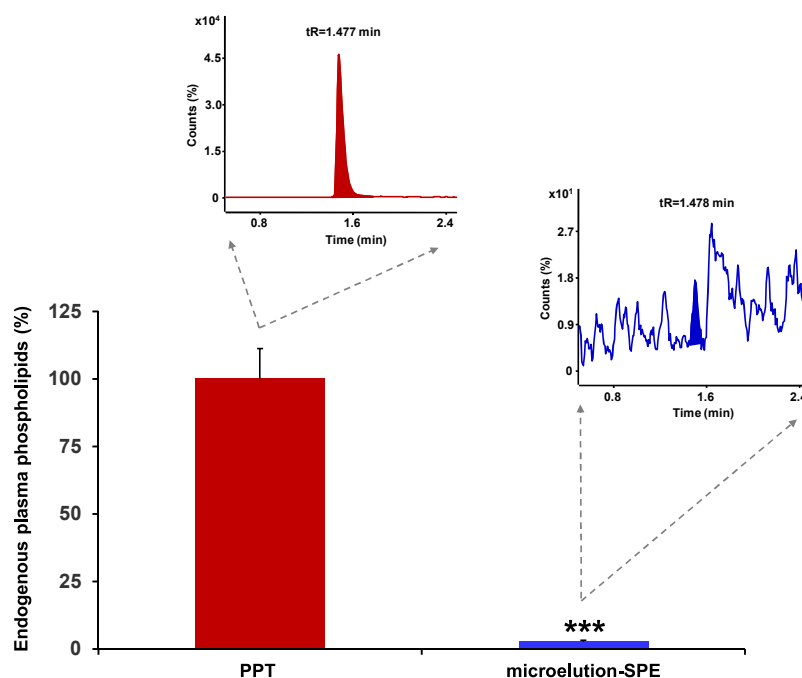
The extraction recovery and matrix effect were determined at three concentration levels: LLOQ, low and high QC. Table 3 summarizes the results for absolute and relative extraction recoveries and matrix effects in percentages (100% is referred as 100% of recovery/no matrix effect) with mean and CV values calculated for each sample. The absolute mean recoveries were found between 88% and 96% for both compounds, as well as for IS. However, the relative recovery values were more desirable compared to absolute values, as they have been achieved between 96% and 106% for ARI and DARI. We have achieved appropriate values of absolute mean matrix effect for all compounds (between 90% and 100%). The relative mean of matrix effect was in the range of 92% to 105%.

Therefore, the extraction procedure was accurate and reproducible, no significant matrix effect was observed with CV values which were less than 9% in all cases.

Extraction procedure applied in the present work enables direct sample injection into the LC-MS/MS without evaporation and reconstitution process. Three-step microelution-SPE applied for sample preparation and the use of SIL-IS enables decrease of matrix effect and improves assay selectivity, which is similar to that reported by Patel et al. [22]. However, most of the methods employed PPT or LLE, which are not efficient in eliminating phospholipids, surfactants, salts [11] and may interfere with ionization process and consequently producing the loss of the analyte signal [28]. Accordingly, our extraction recovery is more efficient (between 96% and 106%) than other methods applying PPT or LLE as sample preparation. The main recoveries reported in the bibliography [5,6,20,21], which used PPT or LLE methods, were ranging from 69% to 123%. Moreover, in spite of large impact of matrix effects in LC-MS/MS analysis [29], this effect has not been taken into account in some of previously described methods [14,15]. Matrix effects' evaluation is usually based on the post-column infusion method [16] or the post-extraction addition method [18], similar to our assay. The advantage of post-extraction addition method over post-column infusion method is the quantitative and not qualitative estimation of ionization suppression/enhancement. Consequently, our results on matrix effects were among the best achieved in the bibliography, similar to those achieved by Patel et al. [22] and De Meulder and co-workers [19]. Patel et al. used SPE as well, but with UHPLC-MS/MS system, which is known of producing less matrix effects due to smaller injection volume and lower flow rates.

To compare our results on phospholipids removal with previously published literature, we have tested twelve human plasma samples with SPE and PPT extraction methods. PPT using organic





**Fig. 3.** Comparison of two extraction methods, protein precipitation (PPT) and microelution-solid phase extraction (microelution-SPE), in order to evaluate endogenous phospholipids removal from biological matrix. Extraction ion chromatogram (XIC) of phospholipids are shown for protein precipitation (PPT) or SPE, retention times (tR) in minutes (min) and area at the top of chromatograms. Data are expressed as mean percentages  $\pm$  standard error of mean (SEM) of twelve human plasma samples. Paired *t*-test, two tailed was performed to compare phospholipids removal using PPT versus microelution-SPE, \*\*\**p* < 0.001.

solvents has been shown to yield the highest degree of matrix effects in comparison with SPE [9]. Thus, it has been used as a positive control of phospholipids' content comparing to SPE. Due to the amphiphilic characteristic of phospholipids, the application of hydrophilic-lipophilic SPE sorbent enabled us to remove efficiently 99.45% endogenous plasma phospholipids compared to PPT method ( $100.00 \pm 11.16\%$  vs  $0.55 \pm 0.47\%$ , *p* < 0.001). Fig. 3 displays endogenous plasma phospholipids' content in percentages using PPT or microelution-SPE, respectively. Additionally, we were able to chromatographically separate phospholipids ( $t_R = 1.477$  min) from analytes elution (ARI,  $t_R = 3.644$  min; DARI,  $t_R = 3.451$  min and ARI-D8,  $t_R = 3.582$  min). Monitoring of phospholipids was useful in method development to avoid the matrix interferences without negative influence on analyte quantification. This is the first report monitoring simultaneously human plasma ARI, DARI and phospholipids in the same acquisition LC-MS/MS method.

### 3.5. Stability

Table 4 summarizes the results of stability assays at low and high QC for ARI (0.5 and 110 ng/ml) and DARI (0.7 and 90 ng/ml). The short-term stability of both analytes after 24 h at room temperature ranged from 87% to 96%, with CV values in the range of 0%–4%. The stability test after 24 h at 4 °C in the fridge also showed

a range of 91% and 99% (CV no higher than 7%). The stability tests after 3 freeze-thaw cycles in the freezer at  $-80^\circ\text{C}$  showed no significant degradation, with stability in the range of 90%–101% and CV in the range of 1–5%. Finally, the stability after 24 h at 19 °C in the autosampler revealed values in a range of 100%–108% (CV does not exceed 5%). The mean stability of the analytes was close to 100% and the CV was less than 7% in all cases.

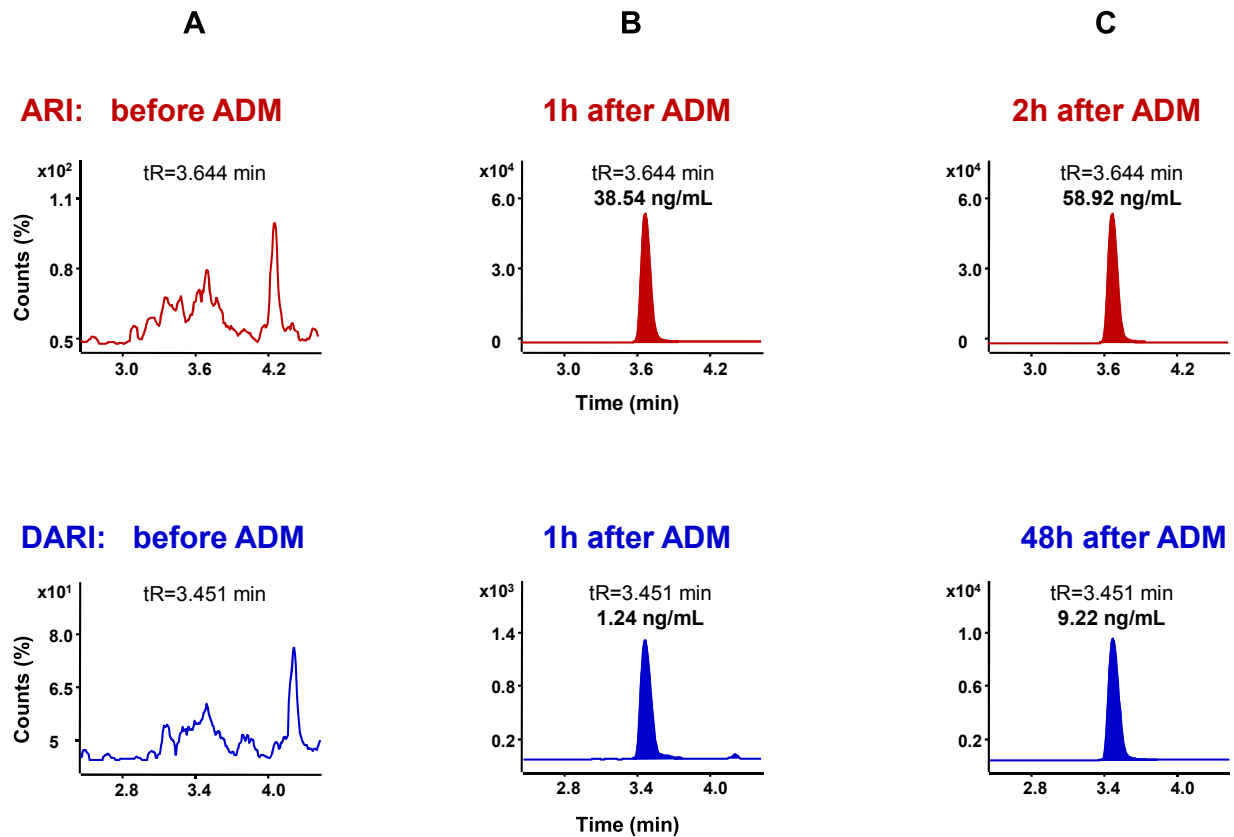
The EMA guideline stresses that analyte stability cannot be proven by literature data [24], further outlining the importance of analyte stability testing. The instability of the analyte and its decomposition influences the precision and accuracy of the procedure and is, thus, accounted for by these two parameters [30]. Therefore, we guaranteed stability of the analytes during sample preparation, the analytical process, and the storage conditions, similar to other authors [21,22]. In spite of its importance, methods without evaluating stability tests are present in the bibliographic data [13].

### 3.6. Carry-over

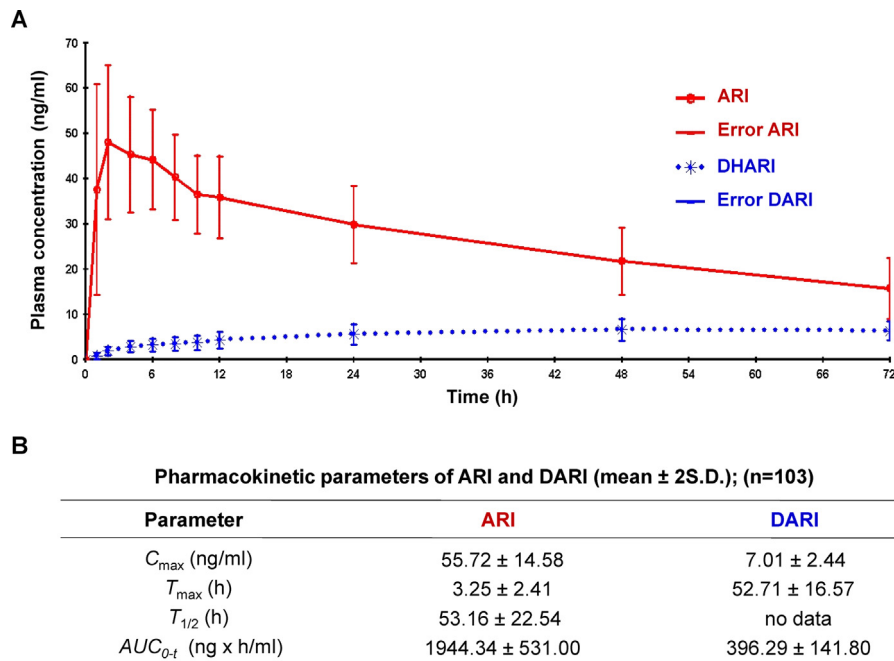
The carry-over in the blank sample following after CAL at highest concentration was  $14.31\% \pm 4.45\%$  of the LLOQ for ARI and  $13.71\% \pm 8.56\%$  for DARI, less than 20%; for IS was 0.01%, less than

**Table 4**  
Stability tests. Storage stability of aripiprazole and dehydro-aripiprazole at low and high concentration in the human plasma sample after 24 h at room temperature, 24 h at 4 °C in the fridge, 3 freeze-thaw cycles ( $-80^\circ\text{C}$ ) and in the human plasma samples extract after 24 h at 23 °C in the autosampler. Results are given as mean percent difference from theoretical concentration  $\pm$  standard deviation (SD). The total number of experiments is shown in parenthesis.

| Compound             | Concentration<br>(ng/mL) (n = 4) | Room Temperature (24 h) |        | Fridge (24 h)     |        | Freeze-thaw (3rd cycle) |        | Autosampler (24 h) |        |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------|--------|-------------------|--------|-------------------------|--------|--------------------|--------|
|                      |                                  | Mean $\pm$ SD (%)       | CV (%) | Mean $\pm$ SD (%) | CV (%) | Mean $\pm$ SD (%)       | CV (%) | Mean $\pm$ SD (%)  | CV (%) |
| Aripiprazole         | 0.5                              | 87.07 $\pm$ 3.68        | 4.23   | 90.58 $\pm$ 2.52  | 2.79   | 90.02 $\pm$ 4.44        | 4.94   | 107.78 $\pm$ 5.57  | 5.17   |
|                      | 110                              | 95.29 $\pm$ 1.19        | 1.25   | 98.33 $\pm$ 1.03  | 1.04   | 101.29 $\pm$ 0.82       | 0.81   | 100.32 $\pm$ 1.65  | 1.64   |
| Dehydro-aripiprazole | 0.7                              | 95.29 $\pm$ 1.55        | 1.63   | 94.53 $\pm$ 6.36  | 6.73   | 97.87 $\pm$ 1.35        | 1.38   | 101.43 $\pm$ 1.56  | 1.54   |
|                      | 90                               | 95.88 $\pm$ 0.43        | 0.45   | 99.38 $\pm$ 1.42  | 1.43   | 100.51 $\pm$ 0.95       | 0.94   | 98.86 $\pm$ 0.32   | 0.32   |



**Fig. 4.** Selectivity of the present LC-MS/MS method in plasma samples from healthy volunteers. Extraction ion chromatogram (XIC) of aripiprazole (ARI), dehydro-aripiprazole (DARI) real samples, before administration (ADM) of 10 mg of ARI (A), 1 h after administration (ADM) of ARI (B) and 2 h (for ARI) and 48 h (for DARI) after ARI administration (C). Retention times (tR) and concentration values calculated from calibration curves are given for both analytes.



**Fig. 5.** Aripiprazole (ARI), dehydro-aripiprazole (DARI) plasma concentration versus time (A) and main pharmacokinetic parameters (B) obtained after a single oral administration of ARI (10 mg) under fasting conditions to 103 healthy volunteers. The pharmacokinetic parameters represented were maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ), time in hours (h) to  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), area under the plasma concentration–time curve ( $AUC_{0-t}$ ) and the half-life ( $T_{1/2}$ ). All pharmacokinetic parameters were expressed as mean concentration  $\pm$  2 SD (standard deviation). There are no data for  $T_{1/2}$  of DARI, because it was impossible to calculate it for 103 healthy volunteers. Data were analyzed with WinNonLin Professional Edition, version 2.0.

5%. Thus, in line with EMA regulations, no significant carry-over effect was observed.

Despite the fact that evaluation of carry-over effect is not mandatory in all guidelines for bioanalytical methods, such as in International Conference on Harmonisation (ICH) [25] or FDA guidelines [23], it should be assessed within the method development and validation. Determination of carry-over effect is a very simple way to detect a possible column contamination after injection of high concentrated CALs and can be included routinely in each analytical run. Unfortunately, the carry-over effect was only evaluated by few authors [18,21,22], showing excellent results.

### 3.7. Application of the method to pharmacokinetics of ARI and DARI in healthy volunteers

This procedure has been successfully applied to several bioequivalence studies. Fig. 4 displays XICs of real samples from healthy volunteers before (A) and after (B and C) a single oral administration of ARI (10 mg). Panel A of Fig. 4 shows an example of the blank real sample for ARI and DARI. Panel B represents chromatographic peaks of ARI and DARI 1 h after ARI administration and panel C demonstrates ARI and DARI concentration at the time points (2 h for ARI and 48 h for DARI) closest to the maximum concentration ( $C_{max}$ ) calculated with WinNonLin (3.25 h for ARI and 52.71 h for DARI, respectively). Fig. 5A exhibits ARI and DARI plasma concentration (ng/ml) versus time (from 0 to 72 h) acquired after a single oral administration of ARI (10 mg) in 103 healthy volunteers (1133 samples). Fig. 5B shows mean pharmacokinetic parameters of ARI and DARI. These results are in line with previous reports on pharmacokinetics by Ravinder and co-workers as well as by Patel et al. ( $C_{max}$  of  $\approx 50$  ng/ml), who used the same single oral dosage. Other authors have reported different levels of  $C_{max}$  due to higher–30 mg [6] or lower administration dose of 5–6 mg [5,17]. In addition to a different dose, the variability in pharmacokinetic results is caused by the use of distinct populations (Caucasian, Chinese and Indian) as well as the comparison of healthy volunteers versus patients. It was not possible to calculate the  $T_{1/2}$  of DARI as the last sample was taken at 48 h instead of 72 h as EMA guidelines requires for long half-life drugs [24].

## 4. Conclusion

In summary, the present method is fast and simple and easily applicable to a large sample number. The method is linear and covers a wide range of the concentration curve from 0.18 to 120 ng/ml for ARI and from 0.35 to 110 ng/ml for DARI. This LC-MS/MS assay is precise, accurate, sensitive, specific, stable and is not showing significant carry-over effects according to FDA, EMA and ICH recommendations and is currently being applied in pharmacokinetic studies. The present method applies effective phospholipids' removal and therefore results in excellent recoveries and no significant matrix effect, thanks to the three-step microelution-SPE sample preparation method and the usage of SIL-IS.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Instituto-Fundación Teófilo Hernando for its continued financial support. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 721236. This work was also supported by FPU12/02220 from MECO to AW. The authors are also grateful to Fernando Tamarit, Julián de la Mata, and Oscar Santos (Agilent Technologies) as well as to Esteban Paniagua (SYMTA) and Waters for technical assistance.

## References

- [1] T. Swainston Harrison, C.M. Perry, Aripiprazole: a review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder, *Drugs* 64 (2004) 1715–1736.
- [2] A. de Bartolomeis, C. Tomasetti, F. Iasevoli, Update on the Mechanism of Action of Aripiprazole: Translational Insights into Antipsychotic Strategies Beyond Dopamine Receptor Antagonism, *CNS Drugs* 29 (2015) 773–799.
- [3] J. de Leon, S.C. Armstrong, K.L. Cozza, The dosing of atypical antipsychotics, *Psychosomatics* 46 (2005) 262–273.
- [4] C. Rafaniello, M. Sessa, F.F. Bernardi, M. Pozzi, S. Cheli, D. Cattaneo, S. Baldelli, M. Molteni, R. Bernardini, F. Rossi, E. Clementi, C. Bravaccio, S. Radice, A. Capuano, The predictive value of ABCB1, ABCG2, CYP3A4/5 and CYP2D6 polymorphisms for risperidone and aripiprazole plasma concentrations and the occurrence of adverse drug reactions, *Pharmacogenomics J.* (2017).
- [5] Y. Akamine, N. Yasui-Furukori, M. Kojima, Y. Inoue, T. Uno, A sensitive column-switching HPLC method for aripiprazole and dehydroaripiprazole and its application to human pharmacokinetic studies, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3292–3298.
- [6] F. Lancelin, K. Djebrani, K. Tabaouti, L. Kraoul, S. Brovedani, P. Paubel, M. Piketty, Development and validation of a high-performance liquid chromatography method using diode array detection for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in human plasma, *J. Chromatogr. B* 867 (2008) 15–19.
- [7] A. Petruczynik, K. Wróblewski, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, H. Karakula-Juchnowicz, J. Gajewski, J. Moryłowska-Topolska, M. Waksmundzka-Hajnos, Determination of some psychotropic drugs in serum and saliva samples by HPLC-DAD and HPLC MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127 (2016) 68–80.
- [8] J.X. Shen, R.J. Motyka, J.P. Roach, R.N. Hayes, Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 359–367.
- [9] O.A. Ismaiel, T. Zhang, R.G. Jenkins, H.T. Karnes, Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3303–3316.
- [10] W.W. Christie, *Mylnefield Lipid Analysis*, 2010 <http://www.lipid.co.uk>.
- [11] E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J.R. Mazzeo, Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 852 (2007) 22–34.
- [12] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [13] H. Kirchherr, W. Kuhnvelten, Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level single-sample approach, *J. Chromatogr. B* 843 (2006) 100–113.
- [14] K.M. Kirschbaum, Therapeutic monitoring of aripiprazole by HPLC with column-switching and spectrophotometric detection, *Clin. Chem.* 51 (2005) 1718–1721.
- [15] M. Kubo, Y. Mizooka, Y. Hirao, T. Osumi, Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantitative determination of aripiprazole and its main metabolite, OPC-14857, in human plasma, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 294–299.
- [16] P. Sistik, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M.E.B. Saldanha, K. Lemr, P. Bednar, Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: a review (2006–2015), *Biomed. Pap.* (2016), <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2015.065.html> (Accessed August 16, 2017).
- [17] M. Song, X. Xu, T. Hang, A. Wen, L. Yang, Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydroaripiprazole in human plasma, *Anal. Biochem.* 385 (2009) 270–277.
- [18] S.-T. Wang, Y. Li, Development of a UPLC-MS/MS method for routine therapeutic drug monitoring of aripiprazole, amisulpride, olanzapine, paliperidone and ziprasidone with a discussion of their therapeutic reference ranges for Chinese patients, *Biomed. Chromatogr.* 31 (2017) e3928.
- [19] M. De Meulder, M.P. Waldron, L. Li, M.G. Peay, M.J. Tingle, B.J. Hidy, T. Verhaeghe, R.G. Jenkins, Development and validation of HILIC-ESI/MS/MS methods for simultaneous quantification of several antipsychotics in human plasma and blood, *Bioanalysis* 8 (2016) 765–794.
- [20] S. Ravinder, A.T. Bapuji, K. Mukkanti, D.R. Raju, H.L.V. Ravikiran, D.C. Reddy, Development and validation of an LC-ESI-MS method for quantitative determination of aripiprazole in human plasma and an application to pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 893–901.
- [21] E. Choong, S. Rudaz, A. Kottelat, D. Guilleme, J.-L. Veuthey, C.B. Eap, Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 1000–1008.
- [22] D.P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, SPE-UPLC-MS/MS method for sensitive and rapid determination of aripiprazole in human plasma to support a bioequivalence study, *J. Chromatogr. B* 925 (2013) 20–25.
- [23] FDA, Homepage, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm> (last access, July 27, 2011).

- [24] EMA, Homepage, Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, 2011, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- [25] ICH, ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methology Q2 (R1), 1994, [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2.R1/Step4/Q2.R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2.R1/Step4/Q2.R1_Guideline.pdf).
- [26] J.L. Little, M.F. Wempe, C.M. Buchanan, Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: examining lipid matrix ionization effects in plasma, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 833 (2006) 219–230.
- [27] A.P. Schellinger, P.W. Carr, Isocratic and gradient elution chromatography: a comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 253–266.
- [28] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 942–950.
- [29] A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M.-L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part II, *Anal. Chim. Acta.* 870 (2015) 8–28.
- [30] A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M.-L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part I, *Anal. Chim. Acta.* 870 (2015) 29–44.

**Artículo 4:** Effect of ABCB1 C3435T polymorphism on pharmacokinetics of antipsychotics and antidepressants.

**Autores:** Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Jiang-Zheng C, Koller D, Mejía G, Zubiaur P, Wojnicz A, Abad-Santos F.

**Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 May 3. [Epub ahead of print]**

# Effect of ABCB1 C3435T Polymorphism on Pharmacokinetics of Antipsychotics and Antidepressants

Miriam Saiz-Rodríguez<sup>1</sup>, Carmen Belmonte<sup>1,2</sup>, Manuel Román<sup>1,2</sup>, Dolores Ochoa<sup>1,2</sup>, Carolina Jiang-Zheng<sup>1</sup>, Dora Koller<sup>1</sup>, Gina Mejía<sup>1,2</sup>, Pablo Zubiaur<sup>1</sup>, Aneta Wojnicz<sup>1</sup> and Francisco Abad-Santos<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain, <sup>2</sup>UICEC Hospital Universitario de la Princesa, Plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain and <sup>3</sup>Center for Biomedical Research Network Hepatic and Liver diseases (CIBERredh) – Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

(Received 19 February 2018; Accepted 18 April 2018)

**Abstract:** P-glycoprotein, encoded by *ABCB1*, is an ATP-dependent drug efflux pump which exports substances outside the cell. Some studies described connections between C3435T polymorphism T allele and lower P-glycoprotein expression; therefore, homozygous T/T could show higher plasma levels. Our aim was to evaluate the effect of C3435T on pharmacokinetics of 4 antipsychotics (olanzapine, quetiapine, risperidone and aripiprazole) and 4 antidepressants (trazodone, sertraline, agomelatine and citalopram). The study included 473 healthy volunteers receiving a single oral dose of one of these drugs, genotyped by real-time PCR. Multivariate analysis was performed to adjust the effect of sex and genotype of the main cytochrome P450 enzymes. C3435T polymorphism had an effect on olanzapine pharmacokinetics, as T/T individuals showed lower clearance and volume of distribution. T/T individuals showed lower  $T_{1/2}$  of 9-OH-risperidone, but this difference disappeared after multivariate correction. T/T homozygous individuals showed lower dehydro-aripiprazole and trazodone area under the concentration-time curve, along with lower half-life and higher clearance of trazodone. C/T genotype was associated to higher citalopram maximum concentration. C3435T had no effect on quetiapine, sertraline or agomelatine pharmacokinetics. C3435T can affect the elimination of some drugs in different ways. Regarding risperidone, trazodone and dehydro-aripiprazole, we observed enhanced elimination while it was reduced in olanzapine and citalopram. However, in quetiapine, aripiprazole, sertraline and agomelatine, no changes were detected. These results suggest that P-glycoprotein polymorphisms could affect CNS drugs disposition, but the genetic factor that alters its activity is still unknown. This fact leads to consider the analysis of *ABCB1* haplotypes instead of individual variants.

P-glycoprotein (P-gp) is an ATP-dependent efflux pump that transports a wide range of xenobiotic compounds, pumping them out of the tissue in which it is expressed [1]. It is coded by *ABCB1* (ATP-binding cassette subfamily B member 1), also known as *MDR1* (multidrug-resistance gene 1) [2,3]. P-gp is expressed in specialized epithelial cells of secretory/excretory organs (liver, kidneys, small intestine) and in endothelial cells of capillary blood vessels at blood–tissue barriers, such as the blood–brain barrier (BBB) or the placenta [4]. Due to the particular localization of this transporter, it is believed that P-gp can have an implication in drug absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) [5,6]. Therefore, P-gp expression level and functional integrity may influence the pharmacokinetics of drugs which are substrates of this transporter [7].

Genetic polymorphisms of *ABCB1* can lead to variations in P-gp expression or function, thus, contributing to inter-individual variability in drug absorption and disposition [8–10]. A large number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in *ABCB1* [11,12]. The most studied polymorphism is the synonymous SNP rs1045642, also known as

C3435T, which is a transition in exon 26 of the *ABCB1* gene that could influence P-gp activity [11].

Some studies have reported a lower P-gp expression in T allele carriers [13–16]. For that reason, if T allele is associated with a reduced functionality of P-gp, it is expected that carriers of this allele show higher levels of P-gp substrate drugs as a consequence of a reduced elimination. However, other studies could not establish any association [17,18]. To date, it remains unclear how C3435T can influence the protein expression and the only confirmed fact is that this SNP alters the substrate specificity [19]. Kimchi-Safarty *et al.* analysed the effect of C3435T by expressing *wild-type* and polymorphic P-gp in HeLa cells. No difference on either mRNA or protein levels was found between the distinct types of cell lines, but altered conformations were detected, suggesting that C3435T polymorphism could change the structure of substrate and inhibitor interaction sites [19].

The presence of P-gp in the BBB explains its involvement in the delivery of drugs targeting the central nervous system (CNS). Second-generation antipsychotics and antidepressants are known to be effective, but a high number of patients do not reach a good treatment response or suffer adverse events (AEs) [20–22]. As most of the CNS-target drugs are P-gp substrates, the expression of this transporter could be a key limiting factor in the treatment of psychiatric diseases. Thus, genetic variations in P-gp might affect the response to

Author for correspondence: Francisco Abad-Santos, Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Diego de León 62. 28006 Madrid, Spain (e-mail francisco.abad@salud.madrid.org).



treatment, remission and side effects risk [23]. Up to the present, although some research studies of major depressive disorder (MDD) and psychosis have shown an influence of *ABCB1* polymorphisms in treatment outcome [24–27], in most cases, these results could not be replicated [28–32].

Our purpose was to study the role of *ABCB1* C3435T polymorphism on the pharmacokinetics of 4 antidepressants (trazodone, sertraline, agomelatine and citalopram) and 4 antipsychotics (aripiprazole, quetiapine, olanzapine and risperidone) in healthy volunteers to elucidate whether it is a relevant pharmacogenetic factor affecting the disposition of antidepressant and antipsychotic drugs.

## Materials and Methods

**Study population.** Our study population comprised 473 healthy volunteers participating in 16 bioequivalence clinical trials performed at the Clinical Trials Unit of Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spain) between 2003 and 2017. A variable number of volunteers of different clinical trials were included in this study: olanzapine (2 trials,  $n = 61$ ), quetiapine (2 trials,  $n = 79$ ), risperidone (2 trials,  $n = 70$ ), aripiprazole (6 trials,  $n = 148$ ), trazodone (1 trial,  $n = 36$ ), sertraline (1 trial,  $n = 34$ ), agomelatine (1 trial,  $n = 28$ ) and citalopram (1 trial,  $n = 17$ ).

The protocols complied with current Spanish Legislation on clinical research in humans and were approved by the Research Ethics Committee, duly authorized by the Spanish Drugs Agency and under the guidelines of Good Clinical Practice. All individuals gave their written informed consent for both clinical trial and pharmacogenetic studies.

The inclusion criteria were as follows: non-smoking male and female volunteers, age 18 to 55 years, body mass index within the 18.5–30.0 range, free from any organic or psychiatric conditions, with normal vital signs, electrocardiogram, medical records and physical examination. Individuals were free to withdraw from the study at any time.

**Study design and procedures.** Each study was a bioequivalence clinical trial where a test formulation was compared to a reference formulation, after a single oral dose administration under fasting conditions. The corresponding dosage of each drug was 5 mg olanzapine, 25 mg quetiapine, 1 mg risperidone, 10 mg aripiprazole, 100 mg trazodone, 100 mg sertraline, 25 mg agomelatine and 30 mg citalopram.

All clinical trials were randomized, open-label, cross-over, two-period, two-sequence, single-centre studies with blind determination of the plasma concentrations of the drug, except agomelatine, which was a replicated study (four-period, four-sequence). Individuals fasted from 10 hr before to 5 hr after drug administration. A variable number of blood samples for the pharmacokinetics assessment were obtained based on the pharmacokinetic characteristics of each compound: 17 samples for olanzapine (from 0 to 96 hr); 15 samples for quetiapine: (0–24 hr); 17 samples for risperidone (0–96 hr); 20 samples for aripiprazole (0–72 hr); 22 samples for trazodone (0–48 hr); 16 samples for sertraline (0–92 hr); 20 samples for agomelatine (0–24 hr) and 16 samples for citalopram (0–120 hr).

Samples were centrifuged for 10 min. at 3500 rpm ( $1900 \times g$ ). All the plasma samples of olanzapine, quetiapine, risperidone, sertraline and citalopram were stored at  $-30^\circ\text{C}$ ; samples of aripiprazole, trazodone and agomelatine were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until its shipment to the external analytical laboratory.

Plasma concentrations of the studied drugs were measured in an accredited external laboratory by reverse phase high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) methods [33–38], validated according to FDA and EMA

guidelines. Moreover, aripiprazole and dehydro-aripiprazole plasma concentrations were determined in our laboratory by a validated HPLC-MS/MS method [39].

**Pharmacokinetic analysis.** Pharmacokinetic parameters were calculated using non-compartmental methods. In the case of risperidone and aripiprazole, we also analysed the pharmacokinetics of their major metabolites (9-OH-risperidone and dehydro-aripiprazole). The analysis was carried out using WinNonlin Professional (version 2.0, Pharsight Corporation, Palo Alto, CA, USA).

The maximum plasma concentration ( $C_{\max}$ ) and time to reach the maximum plasma concentration ( $T_{\max}$ ) were obtained directly from raw data. The area under the curve (AUC) from administration to the last measured concentration ( $\text{AUC}_t$ ) was calculated by linear trapezoidal integration. The total AUC from administration to infinity ( $\text{AUC}_{\infty}$ ) was calculated as the sum of  $\text{AUC}_t$  and the residual area ( $C_t$  divided by  $k_e$ , with  $C_t$  as the last measured concentration and  $k_e$  as the apparent terminal elimination rate, which was estimated by log-linear regression from the terminal portion of the log-transformed concentration–time plots). Half-life ( $T_{1/2}$ ) was calculated by dividing 0.693 by  $k_e$ . Values of AUC correspond to  $\text{AUC}_t$ , except for aripiprazole and dehydro-aripiprazole, where AUC corresponds to  $\text{AUC}_{0-72 \text{ h}}$  and trazodone, sertraline, citalopram and agomelatine where AUC corresponds to  $\text{AUC}_{\infty}$ .

The total drug clearance adjusted for bioavailability ( $\text{Cl}/F$ ) was calculated by dividing the dose by the  $\text{AUC}_{\infty}$  and adjusting for weight. Volume of distribution adjusted for bioavailability ( $V_d/F$ ) was calculated as  $\text{Cl}/F$  divided by  $k_e$ . AUC, and  $C_{\max}$  was adjusted for dose and weight ( $\text{AUC}/\text{dW}$  and  $C_{\max}/\text{dW}$ , divided by the dose-by-weight ratio) and logarithmically transformed for statistical analysis.

We analysed both formulations (test and reference) and considered the mean for each individual as they showed bioequivalence in all the studied drugs except agomelatine. In this case, test formulation was not bioequivalent; therefore, we considered the mean of the two reference administrations.

**Genotyping.** DNA was extracted from 1 mL of peripheral blood samples using MagNA Pure LC DNA Isolation Kit in an automatic DNA extractor (MagNA Pure® System; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) and quantified spectrophotometrically in a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA) where the purity of the samples was measured by  $A_{260}/A_{280}$  absorbance ratio.

The polymorphisms of the individuals participating in risperidone, quetiapine and olanzapine studies were analysed using PharmaChip (Progenika Biopharma S.A., Vizcaya, Spain) [40], a commercial tool which suitability in pharmacogenetic genotyping has been described previously [41,42]. It includes genetic variants previously related to or potentially involved in the outcome of therapy with several drugs.

In the rest of the studies, C3435T polymorphism was genotyped with the StepOnePlus™ instrument (Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA) using the commercial TaqMan assay C<sub>7586657\_20</sub>. Amplification conditions were an initial denaturation step of  $95^\circ\text{C}$  for 10 min.; 50 cycles of  $95^\circ\text{C}$  for 15 sec. and  $60^\circ\text{C}$  for 90 sec.; and a post-PCR read holding stage of  $60^\circ\text{C}$  for 30 sec.

Moreover, we considered the genotype or phenotype data of several cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of these drugs and previously known to have an impact on the pharmacokinetics of the studied drugs. We investigated the effect of *CYP3A5*\*3 (rs776746) in olanzapine [33], *CYP1A2*\*1C (rs2069514) and \*1F (rs762551) in quetiapine [34] and agomelatine, *CYP2D6* phenotype in risperidone [35] and aripiprazole [43], *CYP3A4* \*22 (rs35599367) and *CYP3A5*\*3 in trazodone [37], *CYP2C19* phenotype and *CYP2B6* G516T (rs3745274) in sertraline [38] and *CYP2C19* phenotype in citalopram.

In case of *CYP2C19*, phenotype was inferred from *CYP2C19*\*2 (rs4244285), \*3 (rs4986893) and \*17 (rs12248560) allele determination. For *CYP2D6*, phenotype was inferred from *CYP2D6*\*3 (rs35742686), \*4 (rs3892097), \*5 (deletion), \*6 (rs5030655) and \*9 (rs5030656) allele determination and Copy Number Variation (CNV) analysis. Phenotypes were classified according to CPIC allele definition [44] and allele functionality tables, as the one described by Gaedigk *et al.* for the activity of *CYP2D6* alleles [45].

For this purpose, *CYP2D6*\*3, \*4 and \*5 and *CYP2C19*\*2, \*3 and \*17 polymorphisms were studied by real-time PCR using LightCycler® 2.0 instrument (RocheDiagnostics, Mannheim, Germany). A set of primers and probes were designed by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany). *CYP3A4*\*22, *CYP3A5*\*3, *CYP2B6* G516T, *CYP1A2*\*1C and \*1F, *CYP2D6*\*6 and \*9 polymorphisms were genotyped using a StepOne-Plus™ PCR instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To determine the CNV in *CYP2D6*, we used a TaqMan Copy Number Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as described previously [43].

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed with the SPSS 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). We considered *p* values lower or equal to 0.05 to be statistically significant. The Hardy–Weinberg equilibrium was estimated for the analysed variant.

Table 1.

*ABCB1* C3435T genotype frequencies in the study individuals.

| C3435T Genotype        | Total<br>N (%) | Men<br>n (%) | Women<br>n (%) | <i>p</i> value |
|------------------------|----------------|--------------|----------------|----------------|
| Olanzapine (n = 61)    |                |              |                |                |
| C/C                    | 17 (27.9)      | 8 (25.0)     | 9 (31.0)       | 0.137          |
| C/T                    | 31 (50.8)      | 14 (43.8)    | 17 (58.6)      |                |
| T/T                    | 13 (21.3)      | 10 (31.3)    | 3 (10.3)       |                |
| Quetiapine (n = 79)    |                |              |                |                |
| C/C                    | 19 (24.0)      | 12 (25.0)    | 7 (22.6)       | 0.510          |
| C/T                    | 45 (57.0)      | 26 (54.2)    | 19 (61.3)      |                |
| T/T                    | 15 (19.0)      | 10 (20.8)    | 5 (16.1)       |                |
| Risperidone (n = 70)   |                |              |                |                |
| C/C                    | 18 (25.7)      | 7 (20.0)     | 11 (31.4)      | 0.448          |
| C/T                    | 39 (55.7)      | 22 (69.2)    | 17 (48.6)      |                |
| T/T                    | 13 (18.6)      | 6 (17.1)     | 7 (20.0)       |                |
| Aripiprazole (n = 148) |                |              |                |                |
| C/C                    | 40 (27.0)      | 27 (31.8)    | 13 (20.6)      | 0.102          |
| C/T                    | 72 (48.7)      | 35 (41.2)    | 37 (58.7)      |                |
| T/T                    | 36 (24.3)      | 23 (27.1)    | 13 (20.6)      |                |
| Trazodone (n = 36)     |                |              |                |                |
| C/C                    | 13 (36.1)      | 6 (33.3)     | 7 (38.9)       | 0.790          |
| C/T                    | 20 (55.6)      | 11 (61.1)    | 9 (50.0)       |                |
| T/T                    | 3 (8.3)        | 1 (5.6)      | 2 (11.1)       |                |
| Sertraline (n = 34)    |                |              |                |                |
| C/C                    | 17 (50.0)      | 8 (47.1)     | 9 (52.9)       | 0.807          |
| C/T                    | 11 (32.4)      | 5 (29.4)     | 6 (35.3)       |                |
| T/T                    | 6 (17.6)       | 4 (23.5)     | 2 (11.8)       |                |
| Agomelatine (n = 28)   |                |              |                |                |
| C/C                    | 8 (28.6)       | 4 (25.0)     | 4 (33.3)       | 0.839          |
| C/T                    | 18 (64.3)      | 11 (68.8)    | 7 (58.3)       |                |
| T/T                    | 2 (7.1)        | 1 (6.3)      | 1 (8.3)        |                |
| Citalopram (n = 17)    |                |              |                |                |
| C/C                    | 6 (35.3)       | 3 (33.3)     | 3 (37.5)       | 0.021          |
| C/T                    | 7 (41.2)       | 6 (66.7)     | 1 (12.5)       |                |
| T/T                    | 4 (23.5)       | 0 (0.0)      | 4 (50.0)       |                |
| Total (n = 473)        |                |              |                |                |
| C/C                    | 138 (29.2)     | 75 (28.8)    | 63 (29.6)      | 0.588          |
| C/T                    | 243 (51.4)     | 130 (50.0)   | 113 (53.1)     |                |
| T/T                    | 92 (19.5)      | 55 (21.2)    | 37 (17.4)      |                |

Deviations from the equilibrium were detected by comparing the observed and expected frequencies using a Fisher's exact test based on the De Finetti program (available at [46]). Differences in the genotype frequencies according to sex were determined using a corrected Pearson chi-square test. Differences in pharmacokinetic parameters between individuals with different genotypes were statistically analysed by a parametric univariate analysis (t-test or ANOVA). A multiple regression analysis was performed to evaluate the effect of other possible factors such as sex and cytochrome P450 enzymes in the pharmacokinetic parameters evaluated.

To simplify the analysis, *CYP2C19* genotypes were classified according to the number of functional alleles into poor metabolizers (PM) (\*2/\*2), intermediate metabolizers (IM) (\*1/\*2 and \*2/\*17), normal metabolizers (NM) (\*1/\*1) and ultra-rapid metabolizers (UM) (\*1/\*17 and \*17/\*17). Likewise, *CYP2D6* genotypes were classified into 4 phenotypes (PM, IM, NM and UM) according to the method of Gaedigk *et al.* which is based on the functionality of alleles [45].

## Results

### Genotype frequencies.

A total of 473 healthy volunteers were included in this study (260 men and 213 women). In all cases, the C3435T polymorphism was in Hardy–Weinberg equilibrium. Genotype frequencies of the polymorphism and its comparison between sexes are shown in table 1. Comparing our data with the genotype frequencies of the Iberian population in Spain (IBS) of 1000 Genomes Project database (n = 107) [47], we observed a similar proportion of C/C genotype (29.2% versus 29.9% in IBS), a slightly higher proportion of C/T genotype (51.4% versus 47.7% in IBS) and lower proportion of T/T genotype (19.5% versus 22.4% in IBS), *p* = 0.190.

There were no differences between men and women in the distribution of genotypes (table 1), but in citalopram population where only women carried T/T genotype.

### Pharmacokinetic analysis.

The associations found between some pharmacokinetic parameters of antipsychotics and antidepressants and C3435T polymorphism are shown in tables 2 and 3, respectively. Additionally, the results of multivariate analysis are shown in table 4. Figure 1 shows the comparison of Cl/F of the studied drugs according to individuals' C3435T genotypes. The most important findings are described below.

**Antipsychotics.** We failed to find associations between olanzapine pharmacokinetics and *ABCB1* C3435T genotype in the univariate analysis. However, we observed a slightly higher AUC and lower Cl/F (fig. 1) along with lower *V<sub>d</sub>*/F in T/T individuals. These differences in Cl/F and *V<sub>d</sub>*/F were confirmed in the multivariate analysis (table 4) after correction for sex and *CYP3A5*\*3 genotype.

No differences were found between *ABCB1* C3435T genotype and pharmacokinetic parameters of quetiapine in neither univariate nor multivariate analyses. The influence of sex and *CYP1A2*\*1C genotype on pharmacokinetic parameters was confirmed (table 4).

Although it did not reach statistical significance, pharmacokinetic parameters of risperidone were associated with



Table 2.

ABCB1 C3435T effect on pharmacokinetic parameters of antipsychotics.

| Genotype   | AUC (ng·h/mL)            | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (h)      | T <sub>max</sub> (h) | Cl/F (L/h·kg)          | V <sub>d</sub> /F (L/kg) |
|--|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|
| Olanzapine (n = 61)  |                          |                          |                           |                      |                        |                          |
| C/C  | 300.1 (107.6)            | 9.4 (3.4)                | 32.8 (6.3)                | 4.0 (0.3)            | 0.26 (0.09)            | 11.9 (3.3)               |
| C/T  | 285.4 (91.8)             | 9.4 (2.3)                | 32.9 (6.1)                | 3.6 (1.1)            | 0.26 (0.09)            | 12.1 (3.3)               |
| T/T  | 310.3 (68.0)             | 9.3 (1.1)                | 31.9 (7.6)                | 4.3 (1.8)            | 0.21 (0.04)            | 10.0 (1.8)               |
| Quetiapine (n = 79)  |                          |                          |                           |                      |                        |                          |
| C/C  | 181.1 (80.4)             | 56.2 (17.3)              | 4.0 (1.0)                 | 0.9 (0.4)            | 2.4 (0.7)              | 12.3 (4.2)               |
| C/T  | 211.6 (87.7)             | 63.1 (28.2)              | 3.9 (1.0)                 | 1.0 (0.4)            | 2.1 (1.0)              | 11.6 (3.1)               |
| T/T  | 196.1 (66.7)             | 52.6 (17.3)              | 3.9 (1.0)                 | 1.3 (0.5)            | 2.1 (0.8)              | 11.5 (2.8)               |
| Risperidone (n = 70)                                       |                          |                          |                           |                      |                        |                          |
| C/C  | 65.9 (67.3) <sup>§</sup> | 7.5 (2.8) <sup>§</sup>   | 6.9 (6.7) <sup>§</sup>    | 1.2 (0.6)            | 0.6 (0.6) <sup>§</sup> | 2.7 (0.9)                |
| C/T  | 35.4 (52.3)              | 5.7 (3.0)                | 3.6 (3.0)                 | 1.2 (0.5)            | 1.1 (0.9)              | 3.8 (2.4)                |
| T/T  | 35.6 (42.0)              | 6.0 (3.8)                | 3.8 (3.2)                 | 1.1 (0.5)            | 1.0 (0.7)              | 3.6 (1.5)                |
| Risperidone's metabolite (9-OH-risperidone) (n = 70)       |                          |                          |                           |                      |                        |                          |
| C/C  | 132.3 (54.8)             | 5.0 (3.1)                | 23.0 (5.3) <sup>**§</sup> | 6.5 (4.7)            | 0.15 (0.10)            | 5.5 (4.4)                |
| C/T  | 128.8 (47.4)             | 5.3 (2.2)                | 19.7 (4.4)                | 4.3 (3.4)            | 0.13 (0.07)            | 3.9 (2.8)                |
| T/T  | 127.3 (25.6)             | 5.6 (2.4)                | 19.6 (4.6)                | 4.3 (3.7)            | 0.13 (0.03)            | 3.6 (1.6)                |
| Aripiprazole (n = 148)                                     |                          |                          |                           |                      |                        |                          |
| C/C  | 1514.8 (355.2)           | 47.0 (10.0)              | 47.1 (15.9)               | 3.1 (1.4)            | 66.6 (19.5)            | 4.2 (0.9)                |
| C/T  | 1664.4 (413.2)           | 49.9 (11.2)              | 52.2 (18.8)               | 3.2 (1.7)            | 63.3 (22.6)            | 4.2 (0.7)                |
| T/T  | 1696.6 (420.5)           | 50.7 (11.8)              | 58.9 (26.4)               | 3.1 (1.8)            | 59.7 (23.2)            | 4.2 (0.9)                |
| Aripiprazole's metabolite (dehydro-aripiprazole) (n = 103) |                          |                          |                           |                      |                        |                          |
| C/C  | 417.4 (151.1)            | 7.3 (2.5)                | NA                        | 49.6 (14.2)          | NA                     | NA                       |
| C/T  | 405.7 (141.4)            | 7.2 (2.5)                | NA                        | 50.9 (21.0)          | NA                     | NA                       |
| T/T  | 353.6 (125.7)**          | 6.3 (2.1)                | NA                        | 54.5 (20.0)          | NA                     | NA                       |

Values are presented as mean (S.D.).

\**p* < 0.05.\*\**p* = 0.051 after Bonferroni correction.§*p* < 0.05 when comparing C/C versus C/T+T/T.

NA, not available.

Table 3.

ABCB1 C3435T effect on pharmacokinetic parameters of antidepressants.

| Genotype             | AUC (ng·h/mL)     | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (h) | T <sub>max</sub> (h) | Cl/F (mL/h·kg) | V <sub>d</sub> /F (mL/kg) |
|----------------------|-------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------|---------------------------|
| Trazodone (n = 36)   |                   |                          |                      |                      |                |                           |
| C/C                  | 9023.7 (1970.0)   | 1302.1 (261.9)           | 9.0 (2.4)            | 1.0 (0.6)            | 0.18 (0.07)    | 2.2 (0.6)                 |
| C/T                  | 10430.1 (3519.3)  | 1139.3 (261.0)           | 9.9 (3.7)            | 1.2 (0.7)            | 0.16 (0.06)    | 2.0 (0.5)                 |
| T/T                  | 6183.1 (1015.2)   | 984.7 (262.8)            | 6.2 (1.3)            | 1.7 (2.2)            | 0.25 (0.03)    | 2.3 (0.7)                 |
| Sertraline (n = 34)  |                   |                          |                      |                      |                |                           |
| C/C                  | 924.8 (383.4)     | 31.1 (7.1)               | 26.0 (5.7)           | 5.3 (1.2)            | 1.98 (0.46)    | 66.7 (23.1)               |
| C/T                  | 833.7 (325.8)     | 29.3 (6.0)               | 25.4 (5.3)           | 5.2 (0.9)            | 1.92 (0.53)    | 70.0 (16.7)               |
| T/T                  | 723.6 (338.7)     | 33.0 (9.4)               | 22.0 (4.2)           | 4.7 (1.0)            | 1.93 (0.57)    | 64.9 (7.4)                |
| Agomelatine (n = 28) |                   |                          |                      |                      |                |                           |
| C/C                  | 25659.6 (23406.9) | 19642.4 (20624.9)        | 1.0 (0.2)            | 0.9 (0.1)            | 54.1 (59.9)    | 78.5 (89.3)               |
| C/T                  | 26769.0 (24926.8) | 23498.6 (26107.9)        | 0.9 (0.2)            | 1.3 (0.5)            | 32.7 (27.6)    | 43.4 (44.1)               |
| T/T                  | 14932.1 (73.0)    | 8682.0 (4455.3)          | 0.9 (0.01)           | 1.8 (1.2)            | 28.0 (8.1)     | 37.5 (10.7)               |
| Citalopram (n = 17)  |                   |                          |                      |                      |                |                           |
| C/C                  | 1142.5 (96.3)     | 30.5 (4.2)               | 33.8 (3.6)           | 3.7 (1.5)            | 0.4 (0.1)      | 18.1 (3.4)                |
| C/T                  | 1339.4 (401.0)    | 37.0 (6.5)               | 33.3 (5.3)           | 2.7 (0.7)            | 0.3 (0.1)      | 15.9 (3.1)                |
| T/T                  | 1370.9 (267.1)    | 35.9 (3.8)               | 35.4 (9.8)           | 3.9 (1.4)            | 0.4 (0.1)      | 20.1 (2.2)                |

Values are presented as mean (S.D.).

ABCB1 C3435T genotype, but in the opposite manner than expected as T/T individuals showed lower AUC (*p* = 0.079), C<sub>max</sub> (*p* = 0.058) and T<sub>1/2</sub> (*p* = 0.096) and higher Cl/F (*p* = 0.079) (fig. 1). Grouping the individuals into carriers and non-carriers of T allele, we observed that these

differences were statistically significant (table 2). Moreover, T/T individuals showed a significantly lower T<sub>1/2</sub> of 9-OH-risperidone (*p* = 0.05). Besides, after correction by CYP2D6 phenotype and sex in the multivariate analysis, some of these differences continued to be statistically significant (table 4).

Table 4.  
Results from the multivariate analysis considering ABCB1 C3435T with the principal CYP450 metabolizing enzymes affecting pharmacokinetic parameters of the antipsychotics and antidepressants analysed.

| Variable   | AUC (ng·h/mL)                                 | C <sub>max</sub> (ng/mL)                      | T <sub>1/2</sub> (h)                          | T <sub>max</sub> (h)       | Cl/F (L/h·kg)                                 | V <sub>d</sub> /F (L/kg)                      |
|--|---|---|---|----------------------------|---|---|
| Olanzapine (n = 61)  |   |   |   |                            |   |   |
| CYP3A5*3   | $\beta = 0.260; p = 0.007$                    | —   | —   | —                          | $\beta = -0.273; p = 0.05$                    | $\beta = -0.170; p = 0.025$                   |
| ABCB1 (T/T)  | —   | —   | —   | —                          | <b><math>\beta = -0.212; p = 0.024</math></b> | <b><math>\beta = -0.181; p = 0.015</math></b> |
| Sex  | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| Quetiapine (n = 79)  |   |   |   |                            |   |   |
| CYP1A2 *1C   | $\beta = 0.691; p = 0.021$                    | $\beta = 0.655; p = 0.037$                    | $\beta = 0.391; p = 0.024$                    | —                          | $\beta = -0.615; p = 0.025$                   | —   |
| ABCB1  | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| Sex  | $\beta = 0.236; p = 0.016$                    | —   | —   | —                          | $\beta = 0.177; p = 0.047$                    | $\beta = 2.148; p = 0.048$                    |
| Risperidone (n = 70)                                       |   |   |   |                            |   |   |
| CYP2D6-PM  | $\beta = 2.499; p < 0.001$                    | $\beta = 0.728; p < 0.001$                    | $\beta = 1.775; p < 0.001$                    | $\beta = 0.525; p = 0.028$ | $\beta = -2.466; p < 0.001$                   | $\beta = -0.692; p = 0.001$                   |
| CYP2D6-IM  | $\beta = 0.941; p < 0.001$                    | $\beta = 0.483; p < 0.001$                    | $\beta = 0.506; p < 0.001$                    | —                          | $\beta = -0.940; p < 0.001$                   | $\beta = -0.434; p < 0.001$                   |
| ABCB1-T carriers   | —   | <b><math>\beta = -0.276; p = 0.029</math></b> | —   | —                          | —   | —   |
| Sex  | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| Risperidone's metabolite (9-OH-risperidone) (n = 70)       |   |   |   |                            |   |   |
| CYP2D6-PM  | $\beta = -1.079; p < 0.001$                   | $\beta = -1.897; p < 0.001$                   | $\beta = 0.379; p < 0.001$                    | $\beta = 9.717; p < 0.001$ | $\beta = 1.039; p < 0.001$                    | $\beta = 1.356; p < 0.001$                    |
| CYP2D6-IM  | —   | $B = -0.267; p = 0.004$                       | —   | $\beta = 2.865; p < 0.001$ | —   | —   |
| ABCB1-T carriers   | <b><math>\beta = -0.162; p = 0.043</math></b> | —   | —   | —                          | <b><math>\beta = 0.165; p = 0.037</math></b>  | —   |
| Sex  | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| Aripiprazole (n = 148)                                     |   |   |   |                            |   |   |
| CYP2D6-PM  | —   | —   | —   | —                          | $\beta = -0.396; p = 0.032$                   | —   |
| CYP2D6-IM  | $\beta = -0.146; p < 0.001$                   | $\beta = -0.084; p = 0.009$                   | $\beta = -0.279; p < 0.001$                   | —                          | $\beta = 0.319; p < 0.001$                    | $\beta = 0.064; p = 0.020$                    |
| CYP2D6-UM  | $\beta = -0.181; p = 0.010$                   | —   | $\beta = -0.380; p = 0.003$                   | —                          | $\beta = 0.476; p < 0.001$                    | —   |
| ABCB1  | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| Sex  | $\beta = -0.074; p = 0.013$                   | $\beta = -0.075; p = 0.020$                   | $\beta = 0.189; p = 0.001$                    | —                          | —   | $\beta = 0.170; p < 0.001$                    |
| Aripiprazole's metabolite (dehydro-aripiprazole) (n = 103) |   |   |   |                            |   |   |
| CYP2D6-PM  | —   | —   | NA  | —                          | NA  | NA  |
| CYP2D6-IM  | $\beta = 0.251; p < 0.001$                    | $\beta = 0.223; p < 0.001$                    | NA  | —                          | NA  | NA  |
| CYP2D6-UM  | $\beta = 505; p < 0.001$                      | $\beta = 0.420; p = 0.001$                    | NA  | —                          | NA  | NA  |
| ABCB1 (T/T)  | <b><math>\beta = -0.160; p = 0.022</math></b> | <b><math>\beta = -0.144; p = 0.035</math></b> | NA  | —                          | NA  | NA  |
| Sex  | —   | —   | NA  | —                          | NA  | NA  |
| Trazodone (n = 36)   |   |   |   |                            |   |   |
| CYP3A4/5   | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| ABCB1 (T/T)  | <b><math>\beta = -0.472; p = 0.031</math></b> | —   | <b><math>\beta = -0.395; p = 0.043</math></b> | —                          | <b><math>\beta = 0.465; p = 0.035</math></b>  | $\beta = 0.311; p < 0.001$                    |
| Sex  | —   | $\beta = -0.228; p = 0.006$                   | —   | —                          | —   | —   |
| Sertraline (n = 34)  |   |   |   |                            |   |   |
| CYP2C19-UM   | $\beta = -0.371; p = 0.003$                   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| CYP2B6 (T/T)   | —   | —   | $\beta = 0.375; p < 0.001$                    | —                          | —   | —   |
| ABCB1  | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |
| Sex  | —   | —   | —   | —                          | —   | —   |

(continued)

Table 4. (continued)

| Variable             | AUC (ng·h/mL) | C <sub>max</sub> (ng/mL) | T <sub>1/2</sub> (h) | T <sub>max</sub> (h) | Cl/F (L/h·kg) | V <sub>d</sub> /F (L/kg) |
|----------------------|---------------|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------|--------------------------|
| Agomelatine (n = 28) |               |                          |                      |                      |               |                          |
| CYP1A2               | -             | -                        | -                    | -                    | -             | -                        |
| ABCB1                | -             | -                        | -                    | -                    | -             | -                        |
| Sex                  | -             | -                        | -                    | -                    | -             | -                        |
| Citalopram (n = 17)  |               |                          |                      |                      |               |                          |
| CYP2C19              | -             | -                        | -                    | -                    | -             | -                        |
| ABCB1 (C/T)          | -             | -                        | -                    | -                    | -             | -                        |
| Sex                  | -             | -                        | -                    | -                    | -             | -                        |

β, non-standardized β coefficient; NA, not available. The bold values refer to findings of the principal gene ABCB1.

β = 0.257; p = 0.015

β = 0.252; p = 0.026

We observed a trend in T/T individuals to show higher AUC, C<sub>max</sub> and T<sub>1/2</sub> of aripiprazole ( $p = 0.473$ ,  $p = 0.855$  and  $p = 0.081$ , respectively) (table 2), but this differences did not reach the statistical significance in multivariate analysis after adjusting for *CYP2D6* and sex (table 4). However, we found that individuals with T/T genotype showed lower dehydro-aripiprazole AUC ( $p = 0.051$ ) and C<sub>max</sub> ( $p = 0.077$ ), which was confirmed in the multivariate correction (table 4).

*Antidepressants.* Differing to other drugs, T/T individuals showed lower AUC, C<sub>max</sub> and T<sub>1/2</sub> of trazodone although it did not reach statistical significance ( $p = 0.052$ ,  $p = 0.139$  and  $p = 0.107$ , respectively) (table 3). Moreover, T/T individuals showed higher Cl/F ( $p = 0.054$ ) (fig. 1).

After correction for *CYP3A4* and *CYP3A5* genotype in the multivariate analysis, the differences in AUC and Cl/F remained significant (table 4).

We observed a trend in T/T individuals to show lower Cl/F of sertraline (fig. 1). However, we did not find any association between sertraline pharmacokinetics and C3435T in neither univariate (table 3) nor multivariate analyses (table 4). However, we observed an influence of *CYP2C19* UM phenotype and *CYP2B6* T/T genotype on sertraline AUC and T<sub>1/2</sub>, respectively.

T/T individuals showed lower Cl/F of agomelatine (fig. 1), but these differences did not reach statistical significance in univariate or multivariate analyses (tables 3 and 4).

In the analysis of citalopram, we observed a tendency to show higher AUC, C<sub>max</sub> and T<sub>1/2</sub> in T allele carriers ( $p = 0.450$ ,  $0.054$  and  $p = 0.857$ , respectively) (table 3). In fact, in multivariate analysis with *CYP2C19* phenotype, there was an association between C<sub>max</sub> and ABCB1 C/T genotype (table 4).

## Discussion

Genetic variability on pharmacogenes can influence drug metabolism, transport and elimination. Thus, the way patients respond to pharmacotherapy can be altered, in terms of efficacy or experiencing adverse reactions. Further evidence is needed to support pharmacogenetic testing when initiating antipsychotic or antidepressant therapy. In this regard, *ABCB1* C3435T variant has been widely studied finding discordant results. Even though it has been hypothesized that a rare codon marked by the polymorphism alters the structure of substrate and inhibitor interaction sites *in vitro* [19], the real implications are not clear as the associations found with the pharmacokinetic parameters of several drugs are not consistent or easily reproducible.

### Genotype influence on pharmacokinetics of antipsychotics.

*Olanzapine.* Due to *in vitro* studies, the affinity of olanzapine to P-gp had been questioned [48,49] but *in vivo* studies demonstrated its strong dependence on the transporter [50]. In a clinical trial of 10 healthy male volunteers, Markowitz *et al.* found a significant increase in olanzapine AUC in T/T homozygous of C3435T polymorphism [51]. Further evidence

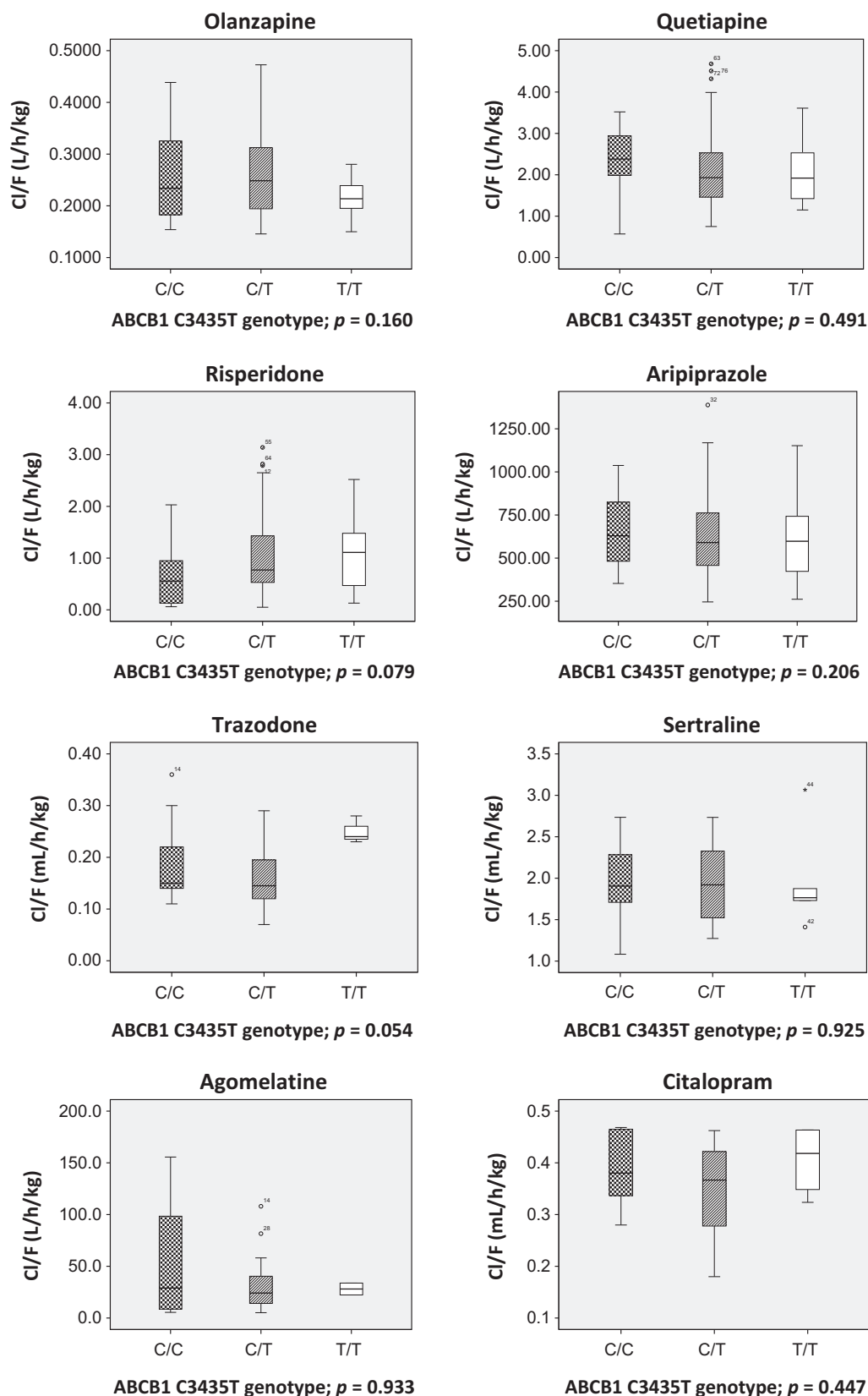


Fig. 1. Boxplot of Cl/F of antipsychotic and antidepressant according to *ABCB1* C3435T genotypes. The bottom and top of the box represent the first and third quartiles, and the band inside the box corresponds to the second quartile (the median). Whiskers extend to the maximum and minimum values of the series or up to 1.5 times the interquartile range. Outliers and extreme outliers (3 times the interquartile range from the box) are plotted with a circle or a star, respectively.

of C3435T influence on olanzapine was provided by Lin *et al.* whose study revealed a better treatment response in patients carrying T/T genotype [27]. Consistently, in our study after correction for the influence of *CYP3A5*\*3 allele [33], we found significantly lower Cl/F and  $V_d/F$  in T/T individuals which means these individuals could accumulate more parent drug and have higher AUC. Nevertheless, later studies failed to reproduce these results in a larger sample size [52,53]. Ghotbi *et al.* analysed the effect of *ABCB1* haplotype on daily-corrected plasma concentrations of olanzapine in 121 patients, and they were unable to find any significant effect [52]. Another study in 87 female patients displayed a similar result with C3435T polymorphism [53]. Differences in the study design and the influence of other genotypes can explain why studies with larger sample size could not find significant differences. Nonetheless, further research is needed on this issue.

**Quetiapine.** Similar to olanzapine, *in vitro* assays attempted to verify the involvement of P-gp in the transport of quetiapine and did not reach a consistent conclusion. Some studies found that quetiapine has high affinity for P-gp [48,49]. However, Grimm *et al.* considered quetiapine as a non-substrate of P-gp [54]. Moreover, another study observed that quetiapine transport across the blood–placenta barrier was not affected by P-gp inhibition [55]. Conversely, regarding the effect of C3435T on quetiapine, the same study found that the T allele was associated with higher placental transfer of quetiapine. A posterior study performed in healthy volunteers observed a higher AUC in individuals with T/T genotype compared to those with C/T genotype [56]. In contrast, we did not find significant correlation between C3435T and quetiapine pharmacokinetics. This outcome matches with the results of Kim *et al.* whose study in healthy volunteers found no association between *ABCB1* polymorphisms and neither quetiapine plasma concentrations nor its pharmacokinetics [57].

A possible explanation for these contradictory results could be due to differences in the study designs such as the sample size or the data analysis procedures. Thus, further studies are required to better understand the above findings.

**Risperidone.** Several studies demonstrated risperidone to be a substrate of P-gp through both *in vitro* assays and *in vivo* animal models [48,58]. It is also proved that risperidone acts as an inhibitor of P-gp and high concentrations of the drug can inhibit its own transport [59]. As risperidone is clearly a P-gp substrate, we expected to see effects of the C3435T polymorphism on its pharmacokinetics. We found several associations of the presence of the T allele with risperidone and 9-OH-risperidone pharmacokinetic parameters. AUC,  $C_{max}$  and  $T_{1/2}$  are lower in carriers of the T allele. According to this trend, we found higher Cl/F levels in T allele carriers, which proved to be statistically significant. Regarding those findings in risperidone, we also observed an association in 9-OH-risperidone whose T allele carriers had lower AUC and  $T_{1/2}$  and higher Cl/F.

According to our knowledge, most studies did not find correlation of C3435T polymorphism with risperidone pharmacokinetics [60,61] or its clinical outcome [62,63]. One study found associations between higher plasma concentrations of risperidone and the presence of T allele [62]. Another study observed the opposite effect: lower plasma concentrations of 9-OH-risperidone associated with an *ABCB1* haplotype, which included the T allele of C3435T [64]. Further studies with pre-selected individuals with either homozygous *wild-type* or homozygous mutated genotypes could be useful to elucidate whether any polymorphisms in *ABCB1* show relevant deviations in risperidone disposition.

**Aripiprazole.** Aripiprazole is a substrate of P-gp [59,65]. A study conducted in *ABCB1*-deficient mice showed that there was not a significantly altered plasma drug concentration but strong effects on aripiprazole concentrations in brain tissue [66]. Likewise, Suzuki *et al.* interrogated the effect of two *ABCB1* polymorphisms (C3435T and G2677T/A) on the steady-state plasma concentrations of aripiprazole in 89 patients, finding that *ABCB1* genotypes seemed unlikely to have an impact on aripiprazole pharmacokinetics [67]. On the contrary, a recent study analysing the effect of C3435T and G2677T/A SNPs found that individuals with 3435TT/2677TT genotype had significantly lower aripiprazole plasma concentrations [68]. Moreover, we have previously reported the influence of another *ABCB1* SNP (C1236T) on the pharmacokinetic parameters of both aripiprazole and its metabolite [43]. In our study, after correction for the impact of *CYP2D6* phenotypes, we could observe that T/T carriers presented significantly lower dehydro-aripiprazole AUC and  $C_{max}$ . As C3435T and C1236T SNPs are in partial linkage disequilibrium ( $R^2 = 0.52$  in IBS) [69], C3435T T allele is correlated with C1236T T allele. This could explain our results, being C1236T the SNP that causes the association with the pharmacokinetic parameters of aripiprazole and its metabolite.

#### *Genotype influence on pharmacokinetics of antidepressants.*

**Trazodone.** Trazodone induces expression of P-gp in cell culture [70]. Augmented expression could induce higher clearance of antidepressants [71] which may explain why C3435T T allele homozygous showed lower concentrations and higher Cl/F of trazodone. We have previously reported that T/T carriers experienced higher incidence of some adverse drug reactions, possibly due to a lower concentration of trazodone and higher concentration of its active metabolite [37]. Further studies should be performed to elucidate whether P-gp may affect the pharmacokinetics of trazodone and its metabolite.

**Sertraline.** Sertraline has high affinity for P-gp *in vitro* [72]. The studies which examine the associations between diverse *ABCB1* SNPs and pharmacokinetics of sertraline failed to find any association. Additionally, we have previously found an influence of *CYP2C19* and *CYP2B6*, but not of *ABCB1* [38], on sertraline pharmacokinetics which was also confirmed in

this study. However, other polymorphisms in *ABCB1*, such as rs2032583, rs2235040 and rs9282564, but not C3435T [73,74], have earlier been linked with remission and side effects of depressive patients treated with sertraline [73,75]. It is necessary to clarify whether this or other polymorphisms in *ABCB1* can affect sertraline disposition and then have an impact on patients' outcome.

**Agomelatine.** Based on our knowledge, there is a lack of studies investigating the effect of C3435T polymorphism on the pharmacokinetics of agomelatine. However, C/C genotype has been previously linked to a better response to agomelatine in patients with depressive disorder [76]. In our study, we were not able to demonstrate an effect on pharmacokinetic parameters, possibly due to the high intra- and inter-individual variability [77] and the low sample size, which only allowed us to find 2 individuals carrying the T/T genotype. Further studies in a large cohort of healthy volunteers and patients will possibly allow evaluating the role of *ABCB1* in agomelatine disposition.

**Citalopram.** There is a tight linkage block ( $R^2 \geq 0.8$ ) of 9 *ABCB1* SNPs in which the presence of the minor alleles has been linked to a better response to substrates of P-gp, like citalopram [23,75]. On the contrary, another study investigating the effect of C3435T, among other polymorphisms, reflects no association with response or tolerance to pharmacological treatment with citalopram [30]. However, up to date, no study examining the effect of C3435T on the pharmacokinetics of citalopram has been performed. We have found a tendency in T allele carriers to have higher AUC and significantly higher  $C_{max}$  in case of C/T genotype which can explain a higher disposition of citalopram and then a better response to treatment. However, the small sample size could be masking a stronger effect.

Recent studies interrogating the effect of the most important pharmacogenes have demonstrated that the majority of variants are very rare and unlikely observed in common approaches [78]. Among them, ABC transporters showed the highest number of variants and the highest very rare (MAF < 0.1%) variants proportion [79]. Approximately 30%–40% of the functional variability can be due to rare variants [79].

Based on our evidence and the reviewed bibliography previously mentioned, we considered insufficient to analyse C3435T as the only *ABCB1* variant with implications in drugs pharmacokinetics. In addition, minimal effects observed in blood can be further noticeable in brain due to the expression of P-gp in the BBB. Indeed, it has been previously stated that differences in concentrations of aripiprazole in serum between wild-type and P-gp K.O. mice were not as significant as the concentrations found in brain [80]. Therefore, further research is a requisite prior to propose a dose adjustment.

#### Study limitations.

A limitation of our study is that the measurements of drug concentrations were performed in blood, but P-gp activity

would be conceivably greater in brain. Moreover, the study design is an important limitation as single-dose administration in healthy individuals prevents us from assessing long-term effectiveness and safety. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability might vary in patients receiving chronic treatment. Additionally, these results must be interpreted with caution given the small sample size for some drugs. Moreover, as the sample size calculation of these studies was not performed for the comparison of genotypes but for evaluation of bioequivalence, the power of the statistical analyses was low. However, a single-dose design in healthy individuals can assess the effect of genetic polymorphisms on antipsychotics and antidepressants without other confounding factors, such as smoking or concomitant treatments. The validity of these results needs to be confirmed in other similar settings with larger sample size and studies in patients receiving chronic treatment.

### Conclusions

Numerous studies have pursued to find associations between diverse SNPs in *ABCB1* and the pharmacokinetic parameters of certain drugs, arising various and conflicting results [81,82]. *ABCB1* C3435T polymorphism can affect the elimination of some drugs in different ways. In case of risperidone, trazodone and dehydro-aripiprazole, we observed enhanced elimination while it was reduced in olanzapine and citalopram. However, in quetiapine, aripiprazole, sertraline and agomelatine, no changes were detected.

Moreover, the slight differences in drugs concentrations identified in blood need to be confirmed in brain to better relate *ABCB1* polymorphism and CNS drug disposition. These results suggest that P-gp could affect CNS drugs disposition, nonetheless, the genetic factor which alters its activity is still unknown. This leads to consider the analysis of *ABCB1* haplotypes instead of individual SNPs. As many *ABCB1* polymorphisms are in partial linkage disequilibrium, C3435T is likely to be in a similar situation with the responsible SNP that is affecting P-gp activity. This fact can explain why C3435T has diverse effects on different drugs.

#### Conflict of Interests and Source of Funding

F. Abad-Santos and D. Ochoa have been consultants or investigators in clinical trials sponsored by the following pharmaceutical companies: Abbott, Alter, Chemo, Cinfa, FAES, Farmalíder, Ferrer, GlaxoSmithKline, Galenicum, Gilead, Janssen-Cilag, Kern, Normon, Novartis, Servier, Silverpharma, Teva and Zambon. D. Koller is co-financed by the H2020 Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Network 721236 grant. M. Saiz-Rodríguez and P. Zubiaur are co-financed by Consejería de Educación, Juventud y Deporte from Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo. The remaining authors declare no conflict of interests.

The authors are grateful to the volunteers and the effort of the staff of the Clinical Trial Unit of Hospital Universitario de la Princesa.



## References

- Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997;**8**:161–70.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;**39**:361–98.
- Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 1996;**6**:610–7.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;**38**:1277–87.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L *et al.* Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;**77**:491–502.
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ *et al.* Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:4028–33.
- Li Y-H, Wang Y-H, Li Y, Yang L. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao* 2006;**33**:93–104.
- Kimchi-Sarfaty C, Griber JJ, Gottesman MM. Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:1–6.
- Gros P, Dhir R, Croop J, Talbot F. A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse *mdr1* and *mdr3* drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:7289–93.
- Umbenhauer DR, Lankas GR, Pippert TR, Wise LD, Cartwright ME, Hall SJ *et al.* Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;**146**:88–94.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:3473–8.
- Saito S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Ogawa C, Kawauchi S *et al.* Three hundred twenty-six genetic variations in genes encoding nine members of ATP-binding cassette, subfamily B (ABCB/MDR/TAP), in the Japanese population. *J Hum Genet* 2002;**47**:38–50.
- Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A *et al.* MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001;**11**:217–21.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI *et al.* Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;**70**:189–99.
- Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T *et al.* MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001;**18**:1400–4.
- Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A *et al.* Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2002;**72**:209–19.
- Pauli-Magnus C, Feiner J, Brett C, Lin E, Kroetz DL. No effect of MDR1 C3435T variant on loperamide disposition and central nervous system effects. *Clin Pharmacol Ther* 2003;**74**:487–98.
- Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM, Pähkla R, Roots I. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;**17**:463–9.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I-W, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV *et al.* A 'silent' polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;**315**:525–8.
- Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L *et al.* Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 2006;**163**:28–40.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO *et al.* Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 2005 Sep;**22**:1209–23.
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, 'just the facts' 5. Treatment and prevention. Past, present, and future. *Schizophr Res* 2010;**122**:1–23.
- Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M *et al.* Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron* 2008;**57**:203–9.
- Kato M, Fukuda T, Serretti A, Wakeno M, Okugawa G, Ikenaga Y *et al.* ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;**32**:398–404.
- Breitenstein B, Scheuer S, Brückl TM, Meyer J, Ising M, Uhr M *et al.* Association of ABCB1 gene variants, plasma antidepressant concentration, and treatment response: results from a randomized clinical study. *J Psychiatr Res* 2016;**73**:86–95.
- Ozbeý G, Yucel B, Taycan SE, Kan D, Bodur NE, Arslan T *et al.* ABCB1 C3435T polymorphism is associated with susceptibility to major depression, but not with a clinical response to citalopram in a Turkish population. *Pharmacol Rep* 2014;**66**:235–8.
- Lin Y-C, Ellingrod VL, Bishop JR, Miller DD. The relationship between P-glycoprotein (PGP) polymorphisms and response to olanzapine treatment in schizophrenia. *Ther Drug Monit* 2006;**28**:668–72.
- Perlis RH, Fijal B, Dharia S, Heinloth AN, Houston JP. Failure to replicate genetic associations with antidepressant treatment response in duloxetine-treated patients. *Biol Psychiatry* 2010;**67**:1110–3.
- Mihaljevic Peles A, Bozina N, Sagud M, Rojnic Kuzman M, Lovric M. MDR1 gene polymorphism: therapeutic response to paroxetine among patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;**32**:1439–44.
- Peters EJ, Slager SL, Kraft JB, Jenkins GD, Reinalda MS, McGrath PJ *et al.* Pharmacokinetic genes do not influence response or tolerance to citalopram in the STAR\*D sample. *PLoS ONE* 2008;**3**:e1872.
- Menu P, Gressier F, Verstuyft C, Hardy P, Becquemont L, Corruble E. Antidepressants and ABCB1 gene C3435T functional polymorphism: a naturalistic study. *Neuropsychobiology* 2010;**62**:193–7.
- Nikisch G, Eap CB, Baumann P. Citalopram enantiomers in plasma and cerebrospinal fluid of ABCB1 genotyped depressive patients and clinical response: a pilot study. *Pharmacol Res* 2008 Dec;**58**:344–7.
- Cabaleiro T, López-Rodríguez R, Ochoa D, Román M, Novalbos J, Abad-Santos F. Polymorphisms influencing olanzapine metabolism and adverse effects in healthy subjects. *Hum Psychopharmacol* 2013;**28**:205–14.
- Cabaleiro T, López-Rodríguez R, Román M, Ochoa D, Novalbos J, Borobia A *et al.* Pharmacogenetics of quetiapine in healthy volunteers: association with pharmacokinetics, pharmacodynamics, and adverse effects. *Int Clin Psychopharmacol* 2015;**30**:82–8.
- Cabaleiro T, Ochoa D, López-Rodríguez R, Román M, Novalbos J, Ayuso C *et al.* Effect of polymorphisms on the pharmacokinetics,

- pharmacodynamics, and safety of risperidone in healthy volunteers. *Hum Psychopharmacol* 2014;**29**:459–69.
- 36 Belmonte C, Ochoa D, Román M, Cabaleiro T, Talegón M, Sánchez-Rojas SD *et al.* Evaluation of the relationship between pharmacokinetics and the safety of aripiprazole and its cardiovascular effects in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 2016;**36**:608–14.
  - 37 Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Derqui-Fernández N, Cabaleiro T, Román M, Ochoa D *et al.* Pharmacogenetics of trazodone in healthy volunteers: association with pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety. *Pharmacogenomics* 2017;**18**:1491–502.
  - 38 Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Koller D, Talegón M *et al.* Effect of polymorphisms on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of sertraline in healthy volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017;**122**:501–11.
  - 39 Wojnicz A, Belmonte C, Koller D, Ruiz-Nuño A, Román M, Ochoa D *et al.* Effective phospholipids removing microelution-solid phase extraction LC-MS/MS method for simultaneous plasma quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole: application to human pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal* 2017;**28**:116–25.
  - 40 Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT *et al.* Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2005;**51**:1137–44.
  - 41 Almoguera B, Riveiro-Alvarez R, Gomez-Dominguez B, Lopez-Rodriguez R, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C *et al.* Evaluating a newly developed pharmacogenetic array: screening in a Spanish population. *Pharmacogenomics* 2010;**11**:1619–25.
  - 42 Cuyàs E, Olano-Martín E, Khymenets O, Hernández L, Jofre-Monseny L, Grandoso L *et al.* Errors and reproducibility of DNA array-based detection of allelic variants in ADME genes: PHARMAchip. *Pharmacogenomics* 2010;**11**:257–66.
  - 43 Belmonte C, Ochoa D, Román M, Saiz-Rodríguez M, Wojnicz A, Gómez-Sánchez CI *et al.* Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms on pharmacokinetics and safety of aripiprazole in healthy volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018;**122**:596–605.
  - 44 Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M *et al.* Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2017;**19**:215–23.
  - 45 Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 2008;**83**:234–42.
  - 46 Hardy-Weinberg equilibrium. [Internet]. <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (last accessed on 19 August 2017).
  - 47 1000 Genomes Project Consortium; Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;**526**:68–74.
  - 48 Boulton DW, DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS. *In vitro* P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life Sci* 2002;**71**:163–9.
  - 49 El Ela AA, Härtter S, Schmitt U, Hiemke C, Spahn-Langguth H, Langguth P. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds—implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J Pharm Pharmacol* 2004;**56**:967–75.
  - 50 Wang J-S, Taylor R, Ruan Y, Donovan JL, Markowitz JS, Lindsay De Vane C. Olanzapine penetration into brain is greater in transgenic Abcb1a P-glycoprotein-deficient mice than FVB1 (wild-type) animals. *Neuropsychopharmacol* 2004;**29**:551–7.
  - 51 Markowitz JS, DeVane CL, Malcolm RJ, Gefroh HA, Wang J-S, Zhu H-J *et al.* Pharmacokinetics of olanzapine after single-dose oral administration of standard tablet versus normal and sublingual administration of an orally disintegrating tablet in normal volunteers. *J Clin Pharmacol* 2006;**46**:164–71.
  - 52 Ghotbi R, Mannheimer B, Aklilu E, Suda A, Bertilsson L, Eliasson E *et al.* Carriers of the UGT1A4 142T>G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure—an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;**66**:465–74.
  - 53 Božina N, Kuzman MR, Medved V, Jovanovic N, Sertic J, Hotujac L. Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients. *J Psychiatr Res* 2008;**42**:89–97.
  - 54 Grimm SW, Richtand NM, Winter HR, Stams KR, Reece SB. Effects of cytochrome P450 3A modulators ketoconazole and carbamazepine on quetiapine pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 2006;**61**:58–69.
  - 55 Rahi M, Heikkinen T, Härtter S, Hakkola J, Hakala K, Wallerman O *et al.* Placental transfer of quetiapine in relation to P-glycoprotein activity. *J Psychopharmacol* 2007;**21**:751–6.
  - 56 González-Vacarezza N, Dorado P, Peñas-Lledó EM, Fariñas H, Estévez-Carrizo FE, Llerena A. MDR-1 genotypes and quetiapine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Drug Metabol Drug Interact* 2013;**28**:163–6.
  - 57 Kim K-A, Joo H-J, Lee H-M, Park J-Y. Influence of ABCB1 and CYP3A5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of quetiapine in healthy volunteers. *Pharmacogenet Genomics* 2014;**24**:35–42.
  - 58 Holthoewer D, Hiemke C, Schmitt U. Induction of drug transporters alters disposition of risperidone - a study in mice. *Pharmaceutics* 2010;**2**:258–74.
  - 59 Wang J-S, Zhu H-J, Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL. Evaluation of antipsychotic drugs as inhibitors of multidrug resistance transporter P-glycoprotein. *Psychopharmacology* 2006;**187**:415–23.
  - 60 Yasui-Furukori N, Mihara K, Takahata T, Suzuki A, Nakagami T, De Vries R *et al.* Effects of various factors on steady-state plasma concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone: lack of impact of MDR-1 genotypes. *Br J Clin Pharmacol* 2004;**57**:569–75.
  - 61 Xiang Q, Zhao X, Zhou Y, Duan JL, Cui YM. Effect of CYP2D6, CYP3A5, and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of risperidone and its active moiety. *J Clin Pharmacol* 2010;**50**:659–66.
  - 62 Jovanović N, Božina N, Lovrić M, Medved V, Jakovljević M, Peleš AM. The role of CYP2D6 and ABCB1 pharmacogenetics in drug-naïve patients with first-episode schizophrenia treated with risperidone. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;**66**:1109–17.
  - 63 Xing Q, Gao R, Li H, Feng G, Xu M, Duan S *et al.* Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics* 2006;**7**:987–93.
  - 64 Gunes A, Spina E, Dahl M, Scordo MG. ABCB1 polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety. *Ther Drug Monit* 2008;**30**:628–33.
  - 65 Wu J, Sha X-Y, Fang X-L. Transport of aripiprazole across Caco-2 monolayer model. *Yao Xue Xue Bao* 2009;**44**:188–91.
  - 66 Wang J-S, Zhu H-J, Donovan JL, Yuan H-J, Markowitz JS, Geesey ME *et al.* Aripiprazole brain concentration is altered in P-glycoprotein deficient mice. *Schizophr Res* 2009;**110**:90–4.
  - 67 Suzuki T, Mihara K, Nakamura A, Kagawa S, Nagai G, Nemoto K *et al.* Effects of genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP3A5, and ABCB1 on the steady-state plasma concentrations of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in Japanese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit* 2014;**36**:651–5.
  - 68 Rafaniello C, Sessa M, Bernardi FF, Pozzi M, Cheli S, Cattaneo D *et al.* The predictive value of ABCB1, ABCG2, CYP3A4/5 and CYP2D6 polymorphisms for risperidone and aripiprazole plasma concentrations and the occurrence of adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J* 2018;**18**:422–30.



- 69 Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics* 2015;**31**:3555–7.
- 70 Störmer E, von Moltke LL, Perloff MD, Greenblatt DJ. P-glycoprotein interactions of nefazodone and trazodone in cell culture. *J Clin Pharmacol* 2001;**41**:708–14.
- 71 Schatzberg AF, DeBattista C, Lazzeroni LC, Etkin A, Murphy GM, Williams LM. ABCB1 genetic effects on antidepressant outcomes: a report from the iSPOT-D trial. *Am J Psychiatry* 2015;**172**:751–9.
- 72 Wang J-S, Zhu H-J, Gibson BB, Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL. Sertraline and its metabolite desmethylsertraline, but not bupropion or its three major metabolites, have high affinity for P-glycoprotein. *Biol Pharm Bull* 2008;**31**:231–4.
- 73 Ray A, Tennakoon L, Keller J, Sarginson JE, Ryan HS, Murphy GM *et al.* ABCB1 (MDR1) predicts remission on P-gp substrates in chronic depression. *Pharmacogenomics J* 2015;**15**:332–9.
- 74 Breitenstein B, Brückl TM, Ising M, Müller-Myhsok B, Holsboer F, Czamara D. ABCB1 gene variants and antidepressant treatment outcome: a meta-analysis. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2015;**168B**:274–83.
- 75 de Klerk OL, Nolte IM, Bet PM, Bosker FJ, Snieder H, den Boer JA *et al.* ABCB1 gene variants influence tolerance to selective serotonin reuptake inhibitors in a large sample of Dutch cases with major depressive disorder. *Pharmacogenomics J* 2013;**13**:349–53.
- 76 Jeleń AM, Sałagacka A, Żebrowska MK, Mirowski M, Talarowska M, Gałęcki P *et al.* The influence of C3435T polymorphism of the ABCB1 gene on genetic susceptibility to depression and treatment response in polish population - preliminary report. *Int J Med Sci* 2015;**12**:974–9.
- 77 Li C, Xu J, Zheng Y, Chen G, Wang J, Ma L *et al.* Bioequivalence and pharmacokinetic profiles of agomelatine 25-mg tablets in healthy chinese subjects: a four-way replicate crossover study demonstrating high intra- and inter-individual variations. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2017;**65**:524–9.
- 78 Schärfe CPI, Tremmel R, Schwab M, Kohlbacher O, Marks DS. Genetic variation in human drug-related genes. *Genome Med* 2017;**9**:117.
- 79 Kozyra M, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Rare genetic variants in cellular transporters, metabolic enzymes, and nuclear receptors can be important determinants of interindividual differences in drug response. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2017;**19**:20–9.
- 80 Kirschbaum KM, Uhr M, Holthoewer D, Namendorf C, Pietrzik C, Hiemke C *et al.* Pharmacokinetics of acute and sub-chronic aripiprazole in P-glycoprotein deficient mice. *Neuropharmacology* 2010;**59**:474–9.
- 81 Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J* 2007;**7**:154–79.
- 82 Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of genetic polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: update of the literature. *Clin Pharmacokinet* 2015;**54**:709–35.

**OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL**

**Artículo 5:** Polymorphisms associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis.

**Autores:** Ovejero-Benito MC, Prieto-Pérez R, Llamas-Velasco M, Belmonte C, Cabaleiro T, Román M, Ochoa D, Talegón M, Saiz-Rodríguez M, Daudén E, Abad-Santos F.

**Pharmacogenomics. 2017 May;18(7):631-638.**

**Resumen****AIM:**

Few studies have evaluated the influence of pharmacogenetics in psoriatic patients treated with etanercept.

**MATERIALS & METHODS:**

We evaluated the association between 124 polymorphisms with the response to etanercept in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis at 3 months (n = 78) and 6 months of treatment (n = 68).

**RESULTS:**

The results of the multivariate analysis showed an association between polymorphisms rs13437088 (HLA-B/MICA), rs96844 (MAP3K1), rs2431697 (PTTG1), rs9304742 (ZNF816A) and the response to etanercept at 3 months. Besides polymorphisms rs928655 (GBP6) and rs2546890 (IL12B) were associated to response at 6 months.

**CONCLUSIONS:**

Nevertheless, these biomarkers should be validated in large-scale studies before its implementation in clinical practice.

**Artículo 6:** Pharmacogenetics of trazodone in healthy volunteers: association with pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety.

**Autores:** Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Derqui-Fernández N, Cabaleiro T, Román M, Ochoa D, Talegón M, Ovejero-Benito MC, Abad-Santos F.

**Pharmacogenomics. 2017 Nov;18(16):1491-1502.**

## Resumen

### AIM:

The aim was to evaluate the effect of polymorphisms in metabolizing enzymes and transporters on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse effects of trazodone in healthy volunteers.

### MATERIALS & METHODS:

36 healthy volunteers receiving a single 100-mg oral dose of trazodone were genotyped for 11 variants in CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6 and ABCB1 by real-time PCR. Plasma concentrations were measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry method.

### RESULTS & CONCLUSION:

Sex affected the pharmacokinetics of trazodone with higher clearance in women. Polymorphisms in ABCB1, but not in CYP3A or CYP2D6, influenced trazodone pharmacokinetics. Trazodone decreased blood pressure and prolonged the corrected QT interval. CYP2D6 and ABCB1 polymorphisms were associated with the incidence of dizziness and prolonged corrected QT interval, respectively. Subjects with adverse drug reactions had lower concentrations of trazodone suggesting its metabolite (m-chlorophenylpiperazine) could be responsible for these effects.

**Artículo 7:** Polymorphisms associated with adalimumab and infliximab response in moderate-to-severe plaque psoriasis

**Autores:** Ovejero-Benito MC, Prieto-Pérez R, Llamas-Velasco M, Muñoz-Aceituno E, Reolid A, Saiz-Rodríguez M, **Belmonte C**, Román M, Ochoa D, Talegón M, Cabaleiro T, Daudén E, Abad-Santos F.

**Pharmacogenomics. 2018 Jan;19(1):7-16.**

**Resumen**

**AIM:**

This study evaluated the influence of pharmacogenetics in psoriatic patients treated with adalimumab and/or infliximab.

**MATERIALS & METHODS:**

Prospective observational study evaluating the association of 124 polymorphisms with the response to adalimumab or infliximab (PASI75) in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis at 3 months (n = 95) and 6 months of treatment (n = 90). Significant SNPs for univariate analysis were subjected to multivariate analysis.

**RESULTS:**

Five SNPs were associated with PASI75 at 3 months: rs6661932 (IVL), rs2546890 (IL-12B), rs2145623 (NFKBIA), rs9304742 (ZNF816A) and rs645544 (SLC9A8). Furthermore, rs1061624 (TNFR1B) was associated with PASI75 at 6 months.

**CONCLUSION:**

Nevertheless, these biomarkers should be validated in large-scale studies before implementation in clinical practice.

**Artículo 8:** Influence of CYP2C19 Phenotype on the Effect of Clopidogrel in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention Procedure.

**Autores:** Saiz-Rodríguez M, Romero-Palacián D, Villalobos-Vilda C, Caniego JL, Belmonte C, Koller D, Bárcena E, Talegón M, Abad-Santos F.

**Clin Pharmacol Ther. 2018 Mar 14. [Epub ahead of print]**

**Resumen**

This observational retrospective study assessed the antiplatelet response and clinical events after clopidogrel treatment in patients who underwent percutaneous neurointervention, related to CYP2C19 metabolizer status (normal (NM), intermediate/poor (IM-PM), and ultrarapid (UM); inferred from \*2, \*3, and \*17 allele determination). From 123 patients, IM-PM had a higher aggregation value (201.1 vs. 137.6 NM, 149.4 UM,  $P < 0.05$ ) and lower response rate (37.5% vs. 69.8% NM, 61.1% UM), along with higher treatment change rate (25% vs. 5.7% NM, 10.5% UM). The highest ischemic events incidence occurred in NM (11.3% vs. 6.3% IM, 10.5% UM) and hemorrhagic events in UM (13.2% vs. 0% IM and 3.8% NM). No differences were found regarding ischemic event onset time, while hemorrhagic event frequency in UM was higher with shorter onset time ( $P = 0.047$ ). CYP2C19 no-function and increased function alleles defined the clopidogrel response. UM patients had increased bleeding risk. Therapeutic recommendations should include dose reduction or treatment change in UM

**Artículo 9:** Effect of Polymorphisms on the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Safety of Sertraline in Healthy Volunteers.

**Autores:** Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Koller D, Talegón M, Ovejero-Benito MC, López-Rodríguez R, Cabaleiro T, Abad-Santos F.

**Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 May;122(5):501-511.**

**Resumen**

Sertraline is a selective serotonin reuptake inhibitor widely metabolized in the liver by cytochrome P450 (CYP) enzymes. Besides, it is a P-glycoprotein substrate. Moreover, serotonin transporters and serotonin receptors are involved in its efficacy and safety. The aim of this study was to evaluate the role of polymorphisms of metabolizing enzymes, transporters and receptors on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of sertraline in healthy volunteers. Forty-six healthy volunteers (24 men and 22 women) receiving a 100-mg single oral dose of sertraline were genotyped for 17 genetic variants of CYP enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6), ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4), 5-hydroxytryptamine receptor 2A (HTR2A) and 5-hydroxytryptamine receptor 2C (HTR2C) genes. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters were similar in men and women. Polymorphisms in CYP2C19 and CYP2B6 genes influenced sertraline pharmacokinetics, with a greater effect of CYP2C19. Individuals carrying defective alleles for CYP2C19 and CYP2B6 showed higher area under the curve (AUC) and half-life ( $T_{1/2}$ ). Moreover, CYP2C19\*17 was related to a decreased AUC and  $T_{1/2}$ . No significant effect was found for polymorphisms in CYP2C9, CYP2D6 and ABCB1 on sertraline pharmacokinetics. Sertraline had a small heart rate-lowering effect, directly related to maximum concentration ( $C_{max}$ ) and the presence of ABCB1 minor alleles. Sertraline had no significant effect on blood pressure and QTc. There was a tendency to present more adverse drug reactions in women and individuals with higher AUC of sertraline, such as CYP2C19 intermediate metabolizers and CYP2B6 G516T T/T individuals.

**Artículo 10:** Effects of aripiprazole on pupillometric parameters related to pharmacokinetics and pharmacogenetics in healthy subjects.

**Autores:** Dora Koller, Carmen Belmonte, Rubin Lubomirov, Miriam Saiz-Rodríguez, Pablo Zubiaur, Manuel Román, Dolores Ochoa, Antonio Carcas, Aneta Wojnicz, Francisco Abad-Santos.

**Journal of Psychopharmacology (En fase de revisión).**

## Resumen

**Background:** Pupillometry is used for the detection of autonomic dysfunction related to numerous diseases and drug administration. Genetic variants in cytochrome P450 (CYP) (CYP2D6, CYP3A4), dopamine receptor (DRD2, DRD3), serotonin receptor (HTR2A, HTR2C) and ATP-binding cassette subfamily B (ABCB1) genes were previously associated with aripiprazole response.

**Aims:** Our aim was to evaluate if aripiprazole affects pupil contraction and its relationship with pharmacokinetics and pharmacogenetics.

**Methods:** Thirty-two healthy volunteers receiving a 10 mg single oral dose of aripiprazole were genotyped for 15 polymorphisms in ABCB1, CYP2D6, DRD2, DRD3, HTR2A and HTR2C genes by RT-PCR. Aripiprazole and dehydro-aripiprazole plasma concentrations were measured by HPLC-MS/MS. Pupil examination was performed by automated pupillometry.

**Results:** Aripiprazole caused pupil constriction and reached the peak value at C<sub>max</sub>. HTR2A rs6313 T allele carriers and HTR2C rs3813929 C/T subjects showed higher maximum constriction velocity (MCV) and maximum pupil diameter. Besides, Gly/Gly homozygotes for DRD3 rs6280 showed significantly lower MCV values. A/G heterozygotes for DRD2 rs6277 showed higher total time taken by the pupil to recover 75% of the initial resting size values. CYP2D6 intermediate metabolizers showed higher AUC, C<sub>max</sub> and T<sub>1/2</sub> than extensive metabolizers. ABCB1 G2677T/A A/A homozygotes had greater T<sub>1/2</sub> in comparison with C/C homozygotes. ABCB1 C3435T T allele carriers and C1236T C/T subjects showed greater AUC than C/C homozygotes.

**Conclusions:** Aripiprazole affects pupil contraction, which could be a secondary effect through dopamine and serotonin receptors. Pupillometry could be a useful tool to assess autonomic nervous system activity during antipsychotic treatment.